SÉRIE A, N° 4643
N° D'ORDRE : 5490

# THÈSES

PRÉSENTÉES

## A LA FACULTÉ DES SCIENCES de l'Université de PARIS

POUR OBTENIR

## LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Jean-Bernard LE PECQ

---

### PREMIÈRE THÈSE

Etude spectrofluorimétrique des modalités d'interaction du bromhydrate d'éthidium avec les acides nucléiques

### DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

---

Soutenues le 27 Octobre 1965 devant la Commission d'examen.

| | | |
|---|---|---|
| Melle | LE BRETON | Président |
| MM. | DUBERT<br>GROS<br>JOLY | Examinateurs |

SÉRIE A, N° 4643
N° D'ORDRE : 5490

# THÈSES

PRÉSENTÉES

## A LA FACULTÉ DES SCIENCES de l'Université de PARIS

POUR OBTENIR

## LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Jean-Bernard LE PECQ

---

### PREMIÈRE THÈSE

Etude spectrofluorimétrique des modalités d'interaction du bromhydrate d'éthidium avec les acides nucléiques

### DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

---

Soutenues le 27 Octobre 1965 devant la Commission d'examen.

Melle LE BRETON — Président

MM. DUBERT
GROS — Examinateurs
JOLY

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546824_0061

# FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE PARIS

## PROFESSEURS

Doyen ..... M. ZAMANSKY

| | |
|---|---|
| BRELOT | T Analyse supérieure |
| PRENANT | T Anatomie et Histologie comparée |
| GRASSE | T Evolution des êtres organisés |
| PREVOST | T Chimie organique |
| WYART | T Minéralo & Cristallo |
| TEISSIER | T Zoologie |
| MANGENOT | T Biologie Végé. (Orsay) |
| AUGER | T Physique quantique et Relativité |
| MONNIER | T Physiologie générale |
| PIVETEAU | T Paléontologie |
| ROCARD | T Physique ENS |
| CARTAN | T Mathématiques ENS |
| LAFFITE | T Chimie générale |
| N... | T Géométrie supérieure |
| COULOMB | T Physique du Globe |
| Melle COUSIN | T Biologie Animale SPCN |
| CHRETIEN | T Chimie minérale |
| BOCQUET | T Zoologie |
| KASTLER | T Physique ENS |
| EPHRUSSI | T Génétique |
| RIVIERE | T Géologie SPCN & Sédiment (Orsay) |
| GAUTHERET | T Biologie végétale PCB |
| LUCAS R. | T Recherches Physiques |
| THOMAS A. | T Biologie cellulaire |
| ARNULF | T Optique appliquée |
| MORAND | T Physique Enseignement |
| SOLEILLET | T Physique PCB |
| FORTIER | T Mécanique Exp. des fluides |
| DRACH | T Zoologie |
| QUENEY | T Météorologie & dynamique atmosphérique |
| GALLIEN | T Embryologie |
| EICHORN | T Botanique |
| DE CUGNAC | T Biologie végétale SPCN |
| Melle CAUCHOIS | T Chimie Physique |
| THELLIER | T Physique du Globe |
| L'HERITIER | T Biologie générale Orsay |
| GRIVET | T Radioélectricité Orsay |
| PONCIN | T Mécanique générale |
| DU BREIL | T Arithm. & Théorie des Nombres |
| QUELET | T Chimie Organique |
| CAGNIARD | T Géophysique appliquée |
| CHAMPETIER | T Chimie macromoléculaire |
| CUVILLIER | T Micropaléontologie |
| JUNG | T Géologie |
| TRILLAT | T Microscopie et Diffraction électronique |

| | | |
|---|---|---|
| WIEMANN | T | Chimie organique & struc. |
| JACQUINOT | T | Spectrocospie et Physique céleste (Orsay) |
| VASSY | T | Physique de l'atmosphère |
| DESTOUCHES | T | Théorie Physique |
| AMIEL | T | Chimie générale |
| HOCART | T | Minéralogie & Cristallo |
| J.P. MATHIEU | T | Physique Optique |
| COUTEAUX | T | Cytologie |
| MAY | T | Zoologie |
| CHOQUET | T | Théorie des fonctions et Topologie |
| FELDMANN | T | Biologie végétale marine |
| GUINIER | T | Physique des solides (Orsay) |
| JOST | T | Physiologie comparée |
| FORTET | T | Calcul des probabilités et Physique mathématique |
| SCHWARTZ | T | Calcul diff. & Intégral |
| CHOUARD | T | Physiologie végétale |
| MALAVARD | T | Aviation (Technique Aéronaut.) |
| NORMANT | T | Synthèse organique |
| BENARD | T | Chimie minérale |
| BUVAT | T | Botanique ENS |
| DUGUE | T | Statistiques Mathématiques |
| SOULAIRAC | T | Psychophysiologie |
| ULRICH | T | Physiologie végétale appl. |
| MARECHAL | T | Optique théori. & appliq. |
| KIRRMANN | T | Théories chimiques |
| CHADEFAUD | T | Botanique |
| Melle LE BRETON | T | Physio. de la nutrition |
| LELONG | T | Application de l'analyse à la géométrie |
| DEVILLIERS | T | Anatomie & Histo. comp. |
| EHRESMANN | T | Topologie algébrique |
| FRANCON | T | Physique SPCN |
| GLANGEAUD | T | Géogra phys & géol. |
| DODEMENT | T | Mathématiques MGP |
| PISOT | T | Technique math de la physique |
| ROCH | T | Géologie |
| SCHATZMANN | T | Astrophysique |
| TERMIER | T | Géologie générale |
| ZAMANSKY | T | Mathématiques générale |
| LENNUIER | T | Physique MGP |
| RIZET | T | Génétique Orsay |
| ROUTHIER | T | Géologie appliquée |
| Mme TONNELAT | T | Physique théorique |
| DIXMIER | T | Mathématique MPC |
| SOUCHAY | T | Chimie générale |
| AIGRAIN | T | électrotechnique générale |
| BRUSSET | T | Chimie systématique |
| M.LEVY | T | Physique théorique des hautes énergies (Orsay) |
| Mme CHAIX | T | Chimie biologique |
| Mme HUREL PY | T | Biologievbégérale PCB |
| PANNETIER | T | Chimie générale |
| BRUN | T | Mécanique des fluides I |
| LEDERER | T | Chimie biologique (Orsay) |
| Mme DUBREIL | T | Mathématiques (agréga) |

| | |
|---|---|
| Mme LELONG | T Math II ENS |
| BELLAIR | T Géologie SPCN |
| COTTE | T Physique électricité |
| DUBOIS J.E | T Chimie organique |
| LAMOTTE | T Zoologie ENS |
| MICHEL A. | T Chimie minérale Orsay |
| OLMER | T énergétique générale |
| ROUAULT | T Electricité (Orsay) |
| GAUTHIER | T Mécanique appliquée |
| BARCHEWITZ | T Chimie physique |
| BROSSEL | T Physique atomique |
| BUSER | T Physiologie comparée |
| CAMUS | T Physio végé. |
| CASTAING | T Physique II thermo (Orsay) |
| CURIEN | T Minéralo. & cristal. |
| MOYSE | T Physio. végé. (Orsay) |
| Mme CHARNIAUX-COTTON | T Evolution des êtres organisés |
| POSSOMPES | T Zoologie |
| PULLMANN | T Chimie quantique |
| TEILLAC | T Physique nuc. et radioactivité (Orsay) |
| TONNELAT | T Bio. physico. chimique (Orsay) |
| VILLE | T Econométrie |
| WILLEMART | T Chimie PCB |
| DODE | T Chimie (Orsay) |
| FREYMANN | T Recherches physiques |
| GUINOCHET | T Biologie végé. SPCN (Orsay) |
| ROLLET | T Chimie minérale |
| Mle JOSIEN | T Chimie SPCN |
| CHEVALLEY | T Géométrie algébrique et théorie des groupes |
| ARNOULT | T Electronique Orsay |
| CHAPELLE | T Physique I (Orsay) |
| DELANGE | T Mathématiques I (Orsay) |
| DENY | T Mathématique géné. (Orsay) |
| GERMAIN | T Mécanique théorique des fluides |
| LUCAS | T Géologie |
| ALLARD | T Chimie physique |
| BERTHELOT | T Physique des particules fondamentales (Orsay) |
| BRICARD | T Météor. et physique de l'atmosphère |
| Mme ALBE FESSARD | T Psychophysiologie |
| FRIEDEL | T Physique des solides (Orsay) |
| M. JULIA | T Etudes des moléculaires complexes |
| LENDER | T Biologie animale SPCN (Orsay) |
| MAGAT | T Physico-chimie des radio-éléments |
| Mlle QUINTIN | T Electrochimie |
| MONOD | T Chimie du métabolisme |
| BENOIT | T Physiologie animale (Orsay) |
| DE POSEEL | T Analyse numérique |
| CHARLOT | T Chimie analytique |
| LEMEE | T Ecologie végétale (Orsay) |
| GUERIN | T Chimie MPC (Orsay) |
| CHATELET | T Chimie PCB |
| JEAN | T Physiologie nucléaire (Orsay) |
| MATTLER | T Physique SPCN |

| | | |
|---|---|---|
| BERGERARD | T | Zoologie (Orsay) |
| BERTEIN | T | Electronique Orsay) |
| BOUISSIERES | T | Radiochimie |
| Mme COUTURE | T | Thermo et mécanique physique |
| ELLEMBERGER | T | Géologie des grandes régions du globe (Orsay) |
| FRANC | T | Biologie animale PCB |
| SCHNELL | | Botanique tropicale |
| STLKOWSKI | T | Physiologie végétale |
| ACHER | T | Chimie biologiques |
| BAUDOIN | T | Biologie animale PCB |
| BEAUMONT | | Biologie animale SPCN |
| BLAMONT | | Géophysique ionosphère |
| BOUREAU | T | Botanique |
| CURIE D. | | Physique MGP |
| DURAND DELGA | T | Géologie |
| FREON | T | Chimie organique Orsay |
| HELLER | T | Physiologie végétale |
| TORTRAT | T | Calcul des probabilités |
| CAILLEUX | T | Géologie SPCN |
| MAGNAN | | Physique électricité |
| DAUDEL | T | Mécani. ondulatoire appliquée à la chimie thérique et à la physique nucléaire |
| Mle FOURCROY | | Biologie végétale SPCN |
| Mme CHOQUET BRUHAT | | Mécanique analytique et mécanique céleste |
| Mle VEIL | T | Physiologie générale |
| LWOFF | T | Microbiologie |
| SIESTRUNCK | T | Mécanique physique et expérimentale |
| LACOMBE | T | Métallurgie des métaux nucléaires Orsay |
| BROCHARD | T | Physique PCB Orsay |
| CABANNES | T | Mécanique générale |
| LESIEUR | T | Math I (Orsay) |
| MAZET | T | Mécanique générale (Orsay) |
| CAIRE | | Géographie physique et géo dynamique |
| COMOLET | | Mécanique des fluides |
| CORABOEUF | T | Physiologie animale (Orsay) |
| DELLOUE | T | Physique de l'exosphère |
| GORENFLOT | | Botanique II (Orsay) |
| HOUILLON | | Biologie animale PCB |
| JULLIEN J. | | Chimie SPCN (Orsay) |
| MALGRANGE | T | Technique mathé. de la physique(Orsay) |
| OLIVIER | | Antropologie |
| NOZERAN | T | Botanique II (Orsay) |
| BLANC-LAPIERRE | T | Physique ENS (Orsay) |
| CHEVAUGEON | T | Botanique (Orsay) |
| KAHANE | T | Mathématiques (Orsay) |
| SAMUEL | T | Mathématiques ENS féminines |
| KOURGANOFF | T | Astronomie (Orsay) |
| THIRY | T | Mécanique céleste |
| ABELES | | Physique SPCN |
| AMAT | T | Physique PCB |
| AUBOIN | T | Géologie |
| Mme BENOIT-GUEUTAL | T | Physique nucléaire et radio activité (Orsay) |

| | | |
|---|---|---|
| BOUGIS | | Biologie marine Villefranche/mer |
| BRUHAT | T | Mathématiques MPC |
| BRUNN | T | Géologie historique (Orsay) |
| CHABRAL | T | Physique MGP (Orsay) |
| DEHEUVELS | T | Mathématiques propéd. |
| D'ESPAGNAT | T | Physique théorique (Orsay) |
| FURON | T | Géologie SPCN |
| Mme GANS | T | Génétique |
| GENEVES | | Biologie végétale PCB |
| GUILBERT | | Physique CUS Orléans |
| HUPE | T | Pétrographie |
| HOLLANDE | T | Biologie générale |
| LIONS | T | Analyse numérique |
| MAITTE | T | Chimie PCB |
| MEYER | | Physique propédeut. |
| NICOLAS | | Géologie appliquée |
| PANICEL | | Biologie générale |
| RAVIER | | Pétrographie |
| ROSEAU | T | Mécanique théorique des fluides |
| ROUBINE | | Electronique |
| SILBER | T | Chimie PCB |
| UEBERSFELD | T | Electronique |
| YVON | T | Théories physiques |
| HERVE | T | Mathématiques |
| NERON | T | Mathématiques MPC (Orsay) |
| Mme PECKER WIMEL | T | Astrophysique |
| BALKANSKY | | Physique MPC |
| LE CORRE | T | Electricité |
| DELCROIX | T | Physique théorique (Orsay) |
| GOURDIN | | Physique théorique (Orsay) des hautes énergies |
| LEHMANN | T | Physique exp. des hautes énergies |
| NATAF | T | Physique nucléaire et radioact. (Orsay) |
| ECHALIER | | Biologie animale PCB |
| BARRAUD | | Physiologie cellulaire |
| LIORET | | Physiologie végérale (Orsay) |
| DARS | | Géologie structurale& géol. appl. |
| CAMEFORT | T | Botanique (agrégation) |
| VICHNIEWSKY | T | Mécanique industrielle |
| BLAQUIERE | | Electronique (Orsay) |
| ARNOUS | T | Physique théorique |
| TATIBOUET | | Chimie (CSU Orléans) |
| MALLIAVIN | T | Mathématiques proé. (Orsay) |
| GAUDEMER | | Chimie proé. |
| PEREZ Y JORBA | | Physique Exp. des hautes énergies (Orsay) |
| DAVID | T | Chimie (agrégation Orsay) |
| BROUSSE | T | Mécanique théorique |
| ROSCH | T | Astronomie |
| GUY | T | Physique expérimentale |
| LAZARD | | Mathématiques MPC |
| MOREL Pierre | | Physique MPC |
| ARSAC | | Programmation |
| LEFEBVRE | | CChimie MPC |

| | |
|---|---|
| CHAPEVILLE | Biochimie |
| BENOIT | Physique CPEM |
| RIO | Chimie CPEM |
| JAUZEIN | Géologie ENS |
| PREVOST G. | BV CPEM |
| FAVARD P. | BA CPEM |
| VILKAS | Chimie CPEM |
| Mle FICINI | Chimie CPEM |
| LEQUEUX | Astronomie |
| COHEN TANNOUDJI | Physique MPC |
| TAVERNIER | Physique CPEM |
| Mme ROIZEN | Physique CPEM |
| DURAND M. | BA SPCM |
| PASCAUD | Physiologie |
| Mme PETIT | BA CPEN |
| BROUSSE | Géologie (Orsay) |
| CAGNIAC | Physique agrégation (Orsay) |
| LEBERRE | Zoologie (Orsay) |
| SCHEFFER | Microbiologie (Orsay) |
| de GENNES | Physique des solides (Orsay) |
| RIOU | Physique nucléaire exp. (Orsay) |
| CLAUSER | Chimie biologique (Orsay) |
| CHEVALIER | Physiologie animale (Orsay) |
| JANCOVICI | Physique atomique (Orsay) |
| FALK-VAIRANT | Physique nucléaire (Orsay) |
| FETIZON | Chimie propé. (Orsay) |
| CERF | Mathématiques (Orsay) |
| LEFORT | Chimie nucléaire (Orsay) |
| LURCAT | Physique |
| RICAUDY | Chimie S.P.C.N. |
| SIGWALT | idem |
| FOURNET | Electricité générale |
| COLLONGUES | Chimie C.P.E.N. |
| DUBERT | Biochimie |
| LAVOREL | Biologie physico chimique |
| MOREL F. | Physiologie comparée |
| TALBOT | Génétique chimique |
| Mme NOUGAREDE | Botanique |
| FRANCOIS | Zoologie |
| IVANOFF | Océanographie physique |
| CADIOT | Chimie organique |
| BARUCH | Physique propédeutique |
| NOZIERES | Physique générale |
| BOK | Physique propédeutique |
| SLONIMSKI | Génétique |

LE SECRETAIRE GENERAL..... R. POULLAIN

# ETUDE SPECTROFLUORIMETRIQUE DES MODALITES D'INTERACTION DU BROMHYDRATE D'ETHIDIUM AVEC LES ACIDES NUCLEIQUES

*Application a l'étude des réactions entre polyribonucleotides et au dosage spectrofluorimétrique des acides nucléiques et des nucléases*

*A ma femme,*

*A mon père, A ma mère,*

*en témoignage de ma très profonde affection.*

Mlle LE BRETON, Professeur à la Faculté des Sciences, a bien voulu accepter de présider notre jury. Nous la prions d'agréer l'expression de notre profonde reconnaissance et de nos sentiments de très respectueux dévouement.

M. DUBERT, Professeur à la faculté des Sciences,

M. GROS, Directeur de Recherche au C.N.R.S.

ont bien voulu accepter de juger notre travail. Nous leur exprimons nos sentiments de très respectueuse reconnaissance.

M. JOLY, Directeur de Recherche au C.N.R.S., nous a accueilli dans son laboratoire pendant plus d'une année, et nous a sans cesse prodigué ses précieux conseils. Nous lui exprimons nos sentiments de vif reconnaissance et de très respectueux dévouement.

M. DENOIX, Professeur à la Faculté de Médecine, nous a fait le grand honneur de nous accueillir à l'Institut Gustave Roussy qu'il dirige avec une bienveillante efficacité. Nous le prions d'agréer nos sentiments de très respectueux dévouement.

M. TRUHAUT, Professeur à la Faculté de Pharmacie, nous a fait le grand honneur de nous accueillir dans son laboratoire et de nous compter parmi ses élèves. Nous le prions de bien vouloir accepter l'assurance de notre très respectueux dévouement.

M. PAOLETTI, Professeur agrégé à la Faculté de Pharmacie, a guidé les premiers pas de notre vie scientifique et nous a sans cesse stimulé de ses conseils et encouragements. Nous l'assurons de notre sincère et fidèle amitié et nous lui exprimons notre vive reconnaissance.

Nous tenons à remercier Mlle de TRAVERSAY dont nous avons sans cesse apprécié la qualité de l'aide technique ainsi que tous nos camarades de l'unité de biochimie qui nous ont grandement facilité l'accomplissement de ce travail et plus particulièrement Mme FAYARD, MM. JACQUEMIN-SABLON, GUERINEAU, LAVAL.

# PRINCIPAUX SYMBOLES ET ABREVIATIONS UTILISES

BET : bromhydrate d'éthidium
AN : acides nucléiques
DNA : acide désoxyribonucléique
RNA : acide ribonucléique
poly A : acide poly-adenilique
poly I : acide poly-inosinique
poly C : acide poly-cytidilique
poly U : acide poly-uridilique
poly (A-U), poly (A-I), poly (I-C)
complexes à deux brins entre poly A et poly U, poly A et poly I, poly I et poly C.
poly (A-2U), poly (A-2I)
complexes à trois brins entre poly A et poly U et poly A et poly I
P.V.S. : poly-vinyl-sulfate
DNase, RNase : désoxyribonucléase, ribonucléase
I.F. : intensité de fluorescence
P.M. : poids moléculaire
D.O. : densité optique
$I_1$ : intensité de fluorescence du BET émise en présence d'acides nucléiques
$I_o$ : intensité de fluorescence émise par le BET pur
$I_1 - I_o$ : augmentation de fluorescence du BET provoquée par les acides nucléiques
V : rapport entre l'intensité de fluorescence émise par le BET fixé sur les acides nucléiques et le BET libre
$\varepsilon$ (P) : coefficient d'extinction rapporté à une molécule gramme de phosphore nucléique
$T_m$ : température de fusion des polynucléotides
$\lambda$ em : longueur d'onde de l'émission de la fluorescence
$\lambda$ ex : longueur d'onde de l'excitation de la fluorescence
s : constante de sédimentation
S : unité Svedberg
$\eta$ sp : viscosité spécifique
$\eta$ red : viscosité réduite
$[\eta]$ : viscosité intrinsèque
$\Delta H^\circ$ : variation d'enthalpie
$\Delta S^\circ$ : variation d'entropie
$\Delta G^\circ$ : variation d'énergie libre

# INTRODUCTION

Toute une série de dérivés de la phénanthridine, en particulier le bromhydrate d'éthidium, sont utilisés en médecine vétérinaire comme trypanocides (19) (50). Ils sont doués d'une activité assez spectaculaire puisqu'une seule dose de 1 mg/kg est capable de protéger les bovidés pendant trois mois contre toute infection. On réalise quelle est l'importance de tels produits lorsque l'on considère que dans un quart de l'Afrique qui souffre cruellement de dénutrition, tout élevage de bovidés est rendu aléatoire par la présence de différents trypanosomes.

L'étude du mécanisme d'action de ces médicaments a fait l'objet de multiples recherches. Elles ont fait le sujet récemment de deux revues générales (19) (50).

Nous voudrions seulement attirer l'attention sur quelques points plus particuliers et principalement sur le tropisme de ces drogues pour les acides nucléiques qui a toujours frappé les expérimentateurs. Il a été montré en premier que ces produits inhibaient la synthèse des acides nucléiques (49 (20) puis ELLIOT (16) montra qu'ils inhibaient la DNA-polymérase et suggéra que cette inhibition était due à une interaction de ces composés avec les acides nucléiques. Plus récemment, il fut montré que la RNA-polymérase DNA-dépendante était également inhibée par ces produits et que vraisemblablement cette inhibition était due à une interaction avec le DNA (73).

Deux autres propriétés intéressantes de ces produits retiennent l'attention. C'est d'abord leur action antivirale. Il a été en effet montré que ces produits étaient environ 1000 fois plus toxiques pour le bactériophage que pour la bactérie hôte (8). C'est ensuite leur propriété carcinostatique. Le bromhydrate d'éthidium, s'il n'est doué lui-même que d'une très faible activité carcinostatique, est capable de potentialiser considérablement l'action de l'azasérine (26). Une combinaison de ces deux drogues augmente la durée de vie de souris porteuses d'ascite d'Ehrlich de près de 400 %.

L'ensemble de ces propriétés nous a conduit à porter notre intérêt sur ces composés et en particulier, à en étudier l'interaction avec les acides nucléiques. Dès les premières étapes de ce travail nous observions une propriété étonnante de ces composés ; lorsqu'ils se fixaient sur les acides nucléiques, leur fluorescence, qui normalement en solution aqueuse est très faible

augmentait considérablement *. Aussi c'est principalement cet aspect du problème qui retint notre attention; grâce à cette propriété il devient facile d'étudier avec précision par spectrofluorimétrie les modalités de l'interaction de ces corps avec les acides nucléiques. En faisant cette étude nous constations que cette fixation avec augmentation de la fluorescence était étroitement liée à la structure secondaire des acides nucléiques et permettait d'en apprécier les modifications. C'est ainsi que par ce procédé il fut possible d'étudier les réactions d'hybridation entre polyribonucléotides et de mettre en évidence une réaction d'échange entre polyribonucléotides.

De plus cette propriété fournissait un moyen de doser de façon très sensible, par spectrofluorimétrie les acides nucléiques sous leur forme native.

L'exposé de ce travail sera divisé en quatre chapitres. Après avoir décrit dans un premier chapitre les matériels et les méthodes utilisés, nous exposerons dans le deuxième chapitre les résultats de l'étude des modalités de l'interaction du bromhydrate d'éthidium avec les acides nucléiques. Dans un troisième chapitre, nous exposerons les résultats de l'interaction du bromhydrate d'éthidium avec les polyribonucléotides. Enfin, dans un dernier chapitre, nous montrerons comment il est possible de doser par spectrofluorimétrie les acides nucléiques à l'aide du bromhydrate d'éthidium.

* Cette augmentation de fluorescence lors de la fixation sur les acides nucléiques, peut être, doit-elle être rapprochée des accidents de photosensibilisation des animaux traités par ces produits. On constate en effet que les animaux exposés au soleil et de robe claire font des accidents de photosensinilisation lorsqu'ils sont traités par ces produits (19).

# CHAPITRE I

# MATERIEL ET METHODES

## A - MATERIEL

Tous les produits chimiques non spécifiés étaient des produits Prolabo R.P.

- Acétate mercurique Merck
- Tris (trishydroxymethylaminomethane) Merck
- Quinacrine dichlorhydrate "Spécia" Rhône Poulenc Lot n° 1054
- Nucléotides dTMP, dCMP, dGMP, dAMP, Sigma
- Acide poly I glutamique PM 61.000 Mann Research Laboratories
- Chondroïtine sulfate Mann Research Laboratories
- Acide Hyaluronique (cordon ombilical humain) Mann Research viscosité intrinsèque $[\eta]$ = 3,45
- Héparine Choay lyophilisée
- Albumine de sérum bovin fraction V Armour Lot n° W19.008
- Plasma de lapin :
  est obtenu par ponction cardiaque de lapin "Fauve de Bourgogne".
  Le prélèvement est fait sur héparine, puis centrifugé lentement (2.000 g) pour éviter toute hémolyse. Le plasma est ensuite séparé des éléments figurés par pipetage de la fraction surnageante.
- Chlorure de césium (Merck ultra pur)
  est employé sans purification préalable
- Saccharose Merck,
  il est purifié de la façon suivante :
  1°) pour éliminer les substances absorbantes en U.V.
  après lavage avec de l'alcool absolu avec agitation pendant 24 h. le saccharose est essoré au Buchner, puis séché à l'étuve.
  2°) pour éliminer les RNAses
  on prépare le mélange :

| | |
|---|---|
| saccharose | 200 g |
| $H_2O$ | 600 ml |
| célite hyflosupercel | 10 g |

on agite 24 heures à la température du laboratoire, puis on filtre sur papier Whatman. On évapore alors la solution sous vide au maximum en chauffant doucement au bain marie, puis on précipite par un excès d'alcool absolu, on lave à l'alcool absolu et on sèche à l'étuve.

- DNase I pancréatique bovine cristallisée Worthington
- RNase pancréatique bovine cristallisée Worthington
- DNase II
  L'échantillon que nous avons utilisé était une fraction purifiée à partir de rate de veau par J. LAVAL (36).
- Formaldehyde solution à 40 % Merck
- Bromhydrate d'éthidium (BET) et autres dérivés de la phénanthridine.

Tous ces composés nous ont été fournis gracieusement par le Dr. L. DICKINSON de la "Boots Pure Drug C°" Nottingham - Angleterre.

La formule générale de ces composés est représentée sur la figure 1. Six produits avaient cette formule et R était respectivement

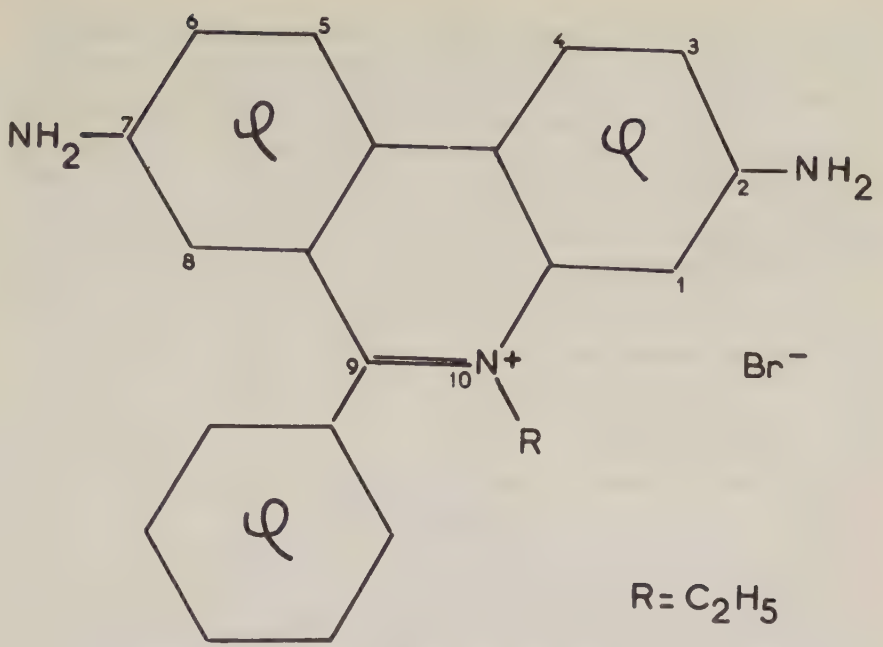
| PRODUIT | NOM DEPOSE | R |
|---|---|---|
| $R_D$ 1572 | ethidium | ethyl |
| $R_D$ 481 | dimidium trypadine | methyl |
| $R_D$ 1427 | | propyl |
| $R_D$ 1446 | | allyl |
| $R_D$ 1602 | | n pentyl |
| $R_D$ 1470 | | n hexyl |

Un dérivé le $R_D$ 1662 était nitré en para sur le radical phényl c'est le : 2,7 diamino 9 paranitro-phenylphénanthridine 10 éthylbromhydrate.

Un dérivé, le $R_D$ 2801 était substitué sur l'azote 7, le prothidium c'est le : 2 amino 7-(2 amino 6-methylpyrimidyl-4-amino) 9 para aminophenyl phénanthridine 10-1' dimethylbromhydrate.

- Actinomycine C Bayer

Pour faire les solutions aqueuses, l'actinomycine est préalablement dissoute dans le minimum d'acétone, laquelle est ensuite diluée dans la quantité voulue de solvant. Les solutions sont employées aussitôt leur préparation




BROMHYDRATE D'ETHIDIUM

FIGURE 1

- Polyvinylsulfate (P.V.S.)
  Sel de potassium Lot 55021
  fabriqué par : Général Biochemicals
  Laboratory Park Chagrin Falls
  OHIO (U.S.A.)

- Polyribonucléotides
  fabriqués par: Laboratories MILES Chemical Company
  ELKMART INDIANA (U.S.A.)

La constante de sédimentation de ces composés était donnée par le fabricant. Nous les avons remesurées sur les solutions ayant servi à nos mesures. Les résultats sont rassemblés dans le tableau I

| | $S_1$ | $S_2$ |
|---|---|---|
| poly A sel de potassium | 12,3 | 8 |
| poly U sel d'ammonium | 9,3 | 4,3 |
| poly C sel de potassium | 7,18 | 3,5 |
| poly I sel de potassium | - | 4,2 |

TABLEAU I

Constantes de sédimentation annoncées par le fabricant (1) et constantes de sédimentation mesurées sur les solutions ayant servi aux mesures (2). La concentration utilisée est environ 30 µg/ml avec le système optique U.V La composition saline des solutions est NaCl 0,1 M, Tris HCL 0,1 M, pH 7,5

La concentration des polyribonucléotides est calculée à partir de la mesure de leur absorption en ultra-violet. Les coefficients molaires d'extinction rapportés au phosphore utilisés sont ceux calculés par SIGLER et al (63) soit :

poly A $\varepsilon$(P) 257 mµ $10 \times 10^3$
poly U $\varepsilon$(P) 260 mµ $10 \times 10^3$
poly I $\varepsilon$(P) 248 mµ $10,4 \times 10^3$
poly C $\varepsilon$(P) 268 mµ $6,3 \times 10^3$

- poly dAT nous a été fourni par le Dr. R.L. BALDWIN

– *Acides nucléiques*

- DNA :

Le DNA de thymus de veau utilisé dans tout ce travail a été préparé au laboratoire par la méthode de SIGNER et SCHWANDER (64).

Les qualités physiques et chimiques de ces DNA ont été systématiquement vérifiées. Les coefficients d'extinction molaires rapportés au phosphore à 260 mµ variaient entre 6.600 et 6.900, les constantes de sédimentation entre 17 et 24 S; les préparations ne contenaient d'autre part que des traces de protéines et de RNA.

Les DNA bactériens utilisés sont ceux de *Micrococcus lyso-*

*deikticus, Escherichia coli, Protéus vulgaris, Pseudomonas fluorescens.* Ils sont préparés au laboratoire * selon la méthode de KIRBY (28) modifiée (35). Les préparations sont traitées par la RNase, puis filtrées sur un gel de séphadex G 100. On sépare alors facilement un premier pic étroit de DNA, puis un deuxième pic assez large d'impuretés contenant principalement du RNA. Les préparations ainsi traitées ne contiennent plus que 0,5 % de RNA , et moins de 0,5 % de protéines. Leur constante de sédimentation était comprise entre 17 S et 20 S et leur coefficient d ' extinction molaire $\varepsilon(P)$ compris entre 6.700 et 6.900.

- DNA de Ø × 174
  nous a été aimablement fourni par le Dr. JANSZ

- **RNA :**

- *RNA total de foie de rat :*

Le RNA utilisé a été préparé au laboratoire ** par la méthode de HIATT (21). Toutes les préparations utilisées ont été au préalable contrôlées par ultracentrifugation analytique. Elles étaient toutes caractérisées par la présence de trois fractions dont les constantes de sédimentation étaient respectivement : 27 S, 16 S et 4 S.

- *RNA de levure :*

Un échantillon de RNA de levure nous a été aimablement fourni par Mr. SACHE des laboratoires Choay. Sa constante de sédimentation était de 4 S.

**-Tampons :**

Les tampons sont préparés selon la formule du "Biochemists Handbook" (45). Les pH de ces tampons sont contrôlés avant leur usage et les pH des solutions sont mesurés après addition du tampon.

## B - METHODES

- Pour la détermination de $\varepsilon(P)$ du DNA, le phosphore est dosé par la méthode de DRYER et al (14).

* Nous remercions Mr. M. GUERINEAU qui nous a fourni ces préparations.

** Nous remercions Mr. A. JACQUEMIN-SABLON qui a préparé ce RNA pour nous.

- Les protéines contaminant les préparations d'AN ont été dosées par la méthode de LOWRY et al (46).

- Le RNA contaminant les préparations de DNA a été estimé selon la méthode de DEFRANCE et al (7).

**- Dosage du DNA et RNA**

**- DNA :**

La concentration de DNA a été mesurée par dosage du désoxyribose selon la méthode de BURTON (4) et/ou par spectrophotométrie à 260 mμ.

**- RNA :**

Le RNA a été dosé par spectrophotométrie à 260 mμ. Il a été supposé que la densité optique d'une solution à 1 μg/ml était égale à 0,030, HIATT (21).

*- Mesure de la fluorescence*

Deux appareils ont été utilisés :

1°) Spectrofluorimétre Aminco Bowman

Cet appareil a été utilisé seulement pour la détermination des spectres d'excitation de fluorescence et pour les mesures des coefficients de polarisation de la lumière fluorescente. Pour cette dernière mesure, deux polariseurs (prismes de Glan) sont utilisés : un polariseur dit polariseur d'excitation placé avant la cuve de mesure, un polariseur dit polariseur d'émission placé après la cuve de mesure. Le polariseur d'excitation est d'abord placé de telle façon que la lumière soit polarisée verticalement (V), puis l'intensité de la fluorescence est mesurée en plaçant d'abord le polariseur d'émission de telle façon qu'il ne laisse passer que la lumière polarisée verticalement (soit $I_{V\,V}$ l'intensité mesurée alors). Le polariseur d'émission est ensuite placé pour laisser passer la lumière horizontale ($I_{V\,H}$ l'intensité mesurée alors dans ces conditions). En plaçant le polariseur d'excitation en position horizontale on mesure de la même façon $I_{HH}$ et $I_{H\,V}$.

Le coefficient de polarisation est alors :

$$P = \frac{I_{VV} - I_{V\,H}\,(I_{H\,V} / I_{H\,H})}{I_{VV} + I_{V\,H}\,(I_{H\,V} / I_{H\,H})}$$

2°) Spectrophotomètre Zeiss PMQ II muni de son dispositif de fluorescence ZFM 4.

Avec cet appareil ont été effectuées toutes les autres mesures de fluorescence. La lumière excitatrice est fournie par une lampe à vapeur de mercure. Les raies de cette lampe sont séparées par des filtres appropriés. Dans le cas considéré seules deux longueurs d'onde d'excitation ont été utilisées ($\lambda ex = 546$ mμ et $\lambda ex = 365$ mμ). Lorsqu'aucune précision ne sera donnée sur les conditions de lecture de la fluorescence, la lumière excitatrice choisie est $\lambda ex$ 546 mμ et la lumière d'émission $\lambda em$ 590 mμ. Avant chaque mesure, l'appareil est étalonné à l'aide d'un étalon de verre trouble fourni par le constructeur. Le monochromateur d'émission est alors réglé de telle façon que l'intensité de la lumière diffusée soit maximale. En cours de manipulation, cette mesure est effectuée à espaces de temps réguliers afin de contrôler la stabilité de l'appareil. La thermorégulation de l'enceinte où se trouvent placées les cuves étant peu efficace, les mesures pour lesquelles l'effet de la température était négligé ont été faites à la température du laboratoire qui était notée. Pour les mesures faites à température élevée, la température de l'enceinte est régulée à la valeur demandée. De plus tous les échantillons étaient placés pendant au moins une demi-heure avant dans un bain-marie réglé à la même température. L'échantillon ne subissait alors pendant la mesure qu'une variation minime de température.

- *Mesure du pH*

Les pH sont mesurés avec un pH mètre radiometer, PH M4 c.

- *Viscosimétrie*

La viscosité est mesurée à l'aide d'un appareil type Couette (44) Lecomte du Nouy à cylindres coaxiaux. Le gradient de vitesse était de 15 $sec^{-1}$.

- *Ultracentrifugation analytique*

a) Mesure des constantes de sédimentation

Les constantes de sédimentation sont mesurées avec le système optique U.V. avec une ultracentrifugeuse analytique Spinco à 44770 t/min. à 20°C. Les concentrations utilisées sont 10 μg/ml pour le DNA et 20 à 30 μg/ml pour le RNA. Dans ces conditions l'effet de la concentration sur la constante de sédimentation peut être négligé. Les films sont révélés dans les mêmes conditions que celles décrites par THOMAS et BERNS (69) puis leur densité optique est enregistrée à l'aide d'un microdensitomètre Joyce MKIIIC

b) Mesure de la densité du DNA en gradient de chlorure de césium.

La méthode utilisée est ici exactement la même que celle décrite par SCHILDKRAUT et al (62) ou VINOGRAD et HEARST (71).

La vitesse de rotation utilisée est 44770 t/min et la température 25°C. Les photographies sont prises après 20 à 24 heures.

La densité de la solution de chlorure de césium était ajustée à environ 1,700 g/cm$^3$ pour le DNA et à 1,650 g/cm$^3$ pour le DNA en présence de BET. La densité des solutions de chlorure de césium est mesurée avant et après centrifugation par picnométrie à l'aide d'une ultra-micro-pipette LANG-LEVY fabriquée par Prolabo de 0,5ml environ. Les densités ainsi mesurées sont reproductibles à ± 0,001 g/cm$^3$.

Les valeurs obtenues pour la densité du DNA sont corrigées en ajoutant 0,003 g/cm$^3$ pour éliminer l'effet du sodium présent dans les solutions de DNA originales.

- *Mesure des températures de fusion des acides nucléiques*

Elles sont déterminées à l'aide d'un spectrophotomètre Zeiss PMQ II ou le porte-cuve est thermostatisé par circulation d'un mélange eau-éthylène-glycol de température convenable. Les cuves sont fermées avec un bouchon de téflon. La température est mesurée dans une cuve témoin à l'aide d'un couple ionitherm 1213. Toutes les solutions sont au préalable dégazées par agitation sous vide.

- *Expression des résultats :*

Pour représenter les courbes de fusions, l'hyperchromicité est calculée pour chaque température, et cette valeur est portée sur un papier de coordonnées Gauss-arithmétique dit papier "probit". On observe alors que la représentation est linéaire (figure2). Il a été montré (11) que la largeur de la transition thermique était le reflet de l'hétérogénéité de composition en base du DNA. Le fait qu'on observe une droite en coordonnées Gauss - arithmétique montre donc que la distribution de la composition en base des molécules de DNA est une distribution gaussienne. Le point d'ordonnée 50% ou de probit 5 a pour abscisse la température de fusion du DNA $T_m$ et la pente de cette droite est égale à $1/\sigma$, $\sigma$ étant l'écart type de la distribution. La pente sera donc d'autant plus grande pour une préparation de DNA donnée, que $\sigma$ sera plus petit et donc que l'hétérogénéité en base sera plus faible. C'est bien ce que l'on observe pour le DNA de thymus de veau et celui de microcoque (figure 2).

- *Séparation du RNA en gradient de saccharose*

Le gradient est préparé selon la méthode de BRITTEN et ROBERTS (2) 0,5 ml de RNA contenant 10 mg sont déposé sur 25 ml de gradient de saccharose 3-18 % en tampon acétate $10^{-2}$M, NaCl 0,1 M, pH 5,1. Le gradient est centrifugé 14 heures à 20.000 t/min dans une ultracentrifugeuse préparative Spinco en utilisant le rotor SW 25.

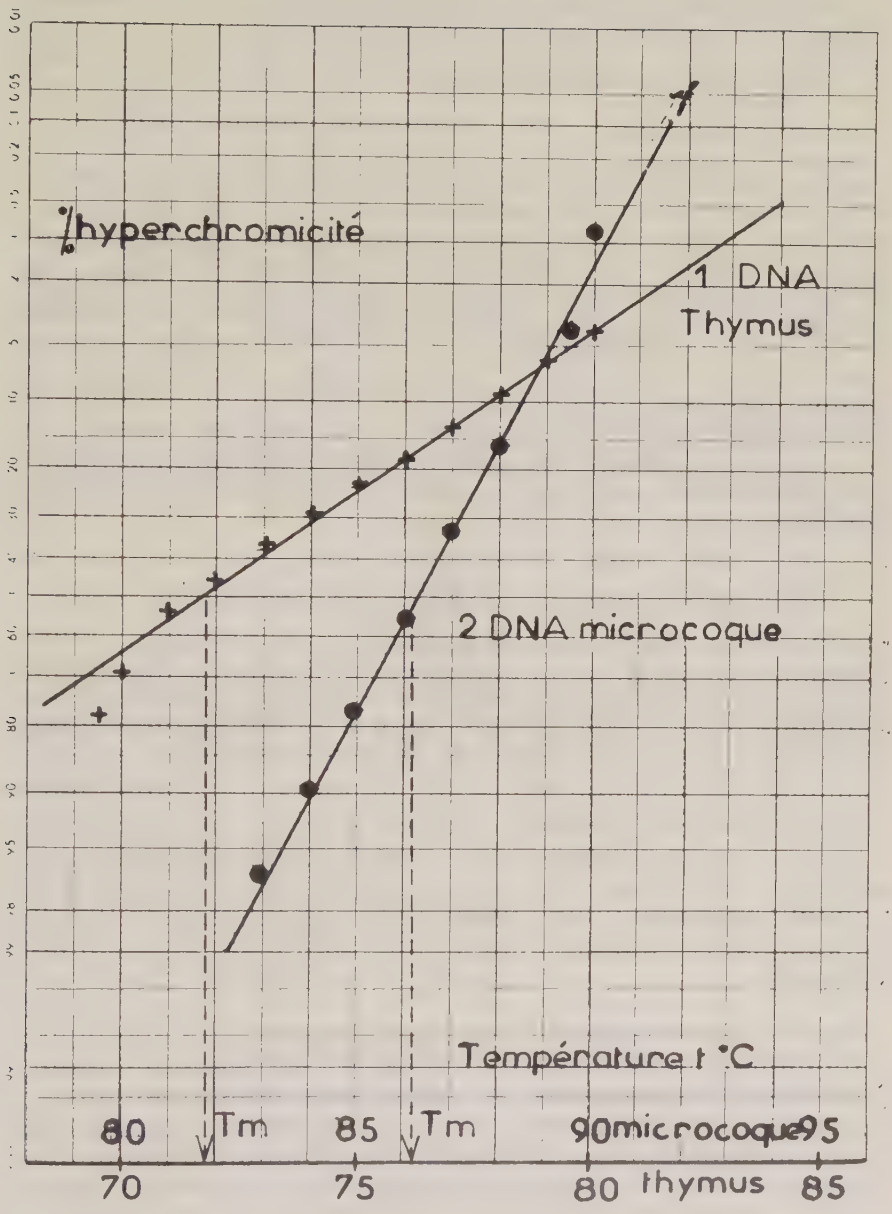



FIGURE 2

Exemple de représentation en coordonnées Gauss-arithmétique des courbes de fusion du DNA.

Ici sont comparées dans les mêmes conditions de concentration saline (tampon phosphate 0,017 M, pH 6,8), les courbes de fusion du DNA de thymus de veau et de Micrococcus Lysodeikticus.

En fin de centrifugation le fond du tube est percé avec une aiguille et les gouttes sont recueillies par fraction de 10 gouttes.

- *Dégradation mécanique du DNA*

- *Ultra-sons*

Une solution de DNA (590 µg/ml NaCl 0,14 M) dégazée par agitation sous vide, puis saturée avec de l'azote en faisant barboter dans la solution un courant d'azote gazeux pendant 10 minutes, est traitée à l'aide d'un appareil SCAM type A4 à quartz avec une fréquence de 960 KHz à 150 watts acoustiques environ, pendant des temps qui varient de 10 secondes à une heure.

- *Turrax* (Ultra-Turrax TP 18/2 fabriqué par JANKE et KUNKEL STAUFEN - Allemagne).

Les solutions, dégazées et saturées d'azote, préparées comme précédemment sont traitées par le Turrax pendant des temps différents.

- *Dénaturation des AN*

- Echantillons seulement chauffés.

Les solutions sont chauffées en ampoules scellées en milieu NaCl 0,01 M, citrate de Na 0,005 M à 100°C 10 minutes, puis immédiatement après, plongées dans la glace fondante.

- Echantillons formolés et chauffés

Les échantillons en NaCl 0,1 M sont chauffés en ampoules scellées à 100°C au bain-marie bouillant pendant 10 minutes avec 0,5 % de formaldehyde, puis immédiatement refroidis dans la glace fondante. L'hyperchromicité obtenue est de 40 % pour le DNA et 23 % pour le RNA.

Le formaldehyde est ensuite neutralisé par un excès de tris ou d'ammoniaque. Pour contrôler que le formaldehyde est bien neutralisé, des témoins sans AN et avec AN formolés neutralisés non chauffés sont également faits dans les mêmes conditions. Un excès de formaldehyde est facilement détecté car le BET en sa présence augmente de fluorescence et le maximum de son spectre d'émission de fluorescence est déplacé à 580 mµ.

- *Hydrolyse par les nucléases*

- DNA :

Une solution de DNA (400 µg/ml dans un tampon tris HCl 0,1 M pH 7,5 $Mg\ Cl_2$ 0,025 M) est incubée 4 heures à 37°C avec 20 µg/ml de DNase I. L'hyperchromicité obtenue est de 33 %.

- RNA :

Une solution de RNA total de foie de rat (400 µg/ml en tampon tris HCl 0,1 M, pH 7,5) est incubée 24 heures à la température du laboratoire avec 20 µg/ml de RNase. L'hyperchromicité obtenue est de 23 %.

- *Etude des réactions d'hybridation entre polyribonucléotides*

Pour cette étude c'est généralement la méthode des variations continues (24 bis) qui est utilisée (66). C'est à dire qu'on effectue un diagramme de mélange entre deux polyribonucléotides susceptibles de s'hybrider de telle façon que la concentration en nucléotide total demeure constante (environ $10^{-4}$ M) et que seule varie la proportion de l'un par rapport à l'autre. La mise en évidence d'un complexe se traduit par une discontinuité dans la variation du coefficient d'absorption pour des longueurs d'onde sélectives (MASSOULIE et al (48)).

- *Préparation des hybrides entre polyribonucléotides*

Les hybrides poly (A-U), poly (A-2U), poly (A-2I) sont préparés à la température du laboratoire en mélangeant des solutions de poly A, poly U et poly I dissous dans NaCl 0,2 M, Tris HCl 0,2 M, pH 7,4. La formation de l'hybride est contrôlée par la mesure de l'hypochromicité à 260 mµ pour les poly (A-U) et poly (A-2U) et à 253 mµ pour le poly (A-2I). Les solutions sont utilisées 24 heures après leur préparation. Les constantes de sédimentation de ces hybrides étaient dans ces conditions :

poly A-U s = 11,9 S
poly A-2U s = 22 S
poly A-2I s = 14,3 S

- *Etude des réactions d'échanges entre polyribonucléotides*

De la même façon que SIGLER et al (63), la méthode des variations continues est utilisée. Comme précédemment la concentration totale exprimée en nucléotides est constante, seule varie la proportion du polyribonucléotide hybride par rapport au polyribonucléotide à un brin.

# CHAPITRE II

## ETUDE DES MODALITES DE L'INTERACTION DU BROMHYDRATE D'ETHIDIUM AVEC LES ACIDES NUCLEIQUES

Ce chapitre sera divisé en trois parties.

- Dans une première partie, nous exposerons les faits expérimentaux qui démontrent l'interaction du BET avec les acides nucléiques.

- Dans une deuxième partie, après avoir montré comment l'étude quantitative de la fixation du BET sur les AN pouvait être réalisée par spectrofluorimétrie, nous exposerons les résultats de l'étude des modalités de cette interaction.

- Dans une troisième partie, nous décrirons quelques caractéristiques moléculaires du complexe DNA-BET. Puis nous discuterons alors l'ensemble des résultats.

### A) DEMONSTRATION DE L'INTERACTION

Pour démontrer que le BET se complexe avec les acides nucléiques, nous avons utilisé trois méthodes :

1°- la spectrophotométrie

2°- l'ultracentrifugation

3°- la spectrofluorimétrie

#### 1°- *Spectrophotométrie*

Le fait que le spectre d'absorption des colorants est modifié lorsqu'ils se complexent avec une macromolécule est un fait bien connu (1) et a été souvent utilisé pour mettre en évidence et étudier ce type de complexation. Le cas le plus simple possible est celui où le colorant n'existe que sous deux états, l'un correspondant à l'état fixé, l'autre à l'état libre. S'il en est ainsi, les deux spectres d'absorption correspondant aux deux états

sont différents, mais peuvent se couper en un ou plusieurs points correspondant à des longueurs d'onde ou les coefficients d'absorption sont identiques. Pour ces points, dits isobestiques, le coefficient d'absorption d'une solution de colorant sera indépendant de la proportion de colorant fixé et ne dépendra que de la concentration totale de colorant. Il en résulte donc que si l'on fait varier cette proportion, en augmentant par exemple la concentration d'un polymère susceptible de complexer le colorant tout en laissant la concentration de colorant constante, tous les spectres d'absorption passeront par ces points isobestiques. L'observation expérimentale de tels points montre non seulement que le colorant peut se complexer avec le polymère, mais aussi qu'il ne peut exister que dans deux états colorés correspondant à l'état libre et à l'état fixé. Si ces conditions sont réalisées une étude quantitative de l'interaction par spectrophotométrie est alors particulièrement aisée.

Sur la figure 3 sont représentées les résultats d'une telle expérience réalisée en faisant varier la concentration de DNA

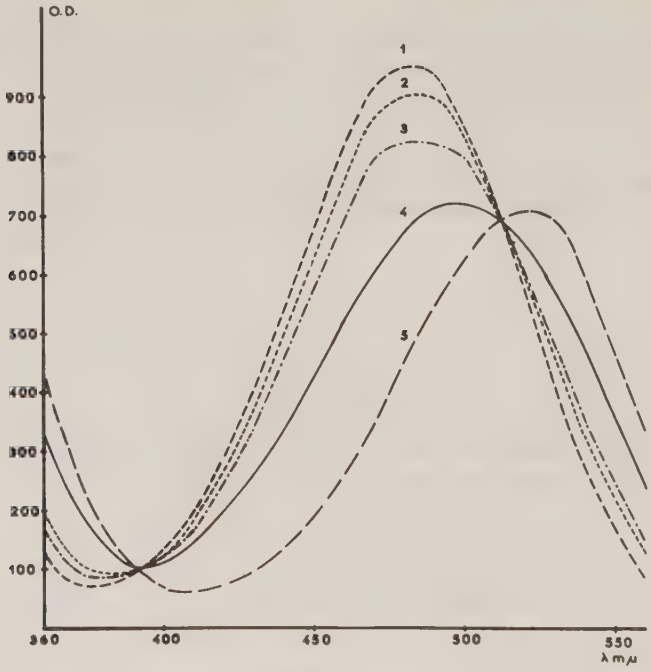



FIGURE 3

Spectre d'absorption du bromhydrate d'ethidium (BET) en présence de différentes concentrations de DNA de thymus de veau.

1° - c = 0 2° - c = 23 µg/ml 3° - c = 45 µg/ml

4° - c = 136 µg/ml 5° - c = 1 mg/ml

La concentration de BET est 75 µg/ml.

La composition saline de la solution est : Tris HCl 0,1 M, pH 7,5

dans une solution de BET de concentration constante. On observe alors dans le domaine du visible deux points isobestiques dans la région de 392 mμ et de 512 mμ. Une telle expérience réalisée avec du RNA total de foie de rat donne un résultat tout à fait identique.

Ces résultats démontrent que le BET se complexe aux DNA et RNA et que l'on ne peut mettre en évidence par spectrophotométrie que deux états, l'un correspondant au BET fixé, l'autre au BET libre.

2°- *Ultracentrifugation analytique*

Si l'on centrifuge une solution de colorant qui a un poids moléculaire très faible, aucune sédimentation ne sera observée. Par contre, si l'on centrifuge ce colorant en présence d'une macromolécule, s'il y a interaction, la macromolécule entrainera en sédimentant une proportion plus ou moins grande de colorant. Lors de la sédimentation, à la frontière solvant solution, il existe un équilibre colorant libre colorant fixé tout à fait comparable à celui existant entre un tube à dialyse et le solvant qui l'entoure. Utilisant ce principe SCHACHMAN (61) a pu réaliser dans une ultracentrifugeuse une véritable expérience d'équilibre de dialyse. Si l'on réalise cette expérience avec le BET et le DNA ou le RNA, on observe qu'une proportion très importante du colorant sédimente avec l'acide nucléique. La figure 4 représente les résultats obtenus avec le RNA. On voit clairement que chaque fraction du RNA entraine une certaine quantité de colorant qui peut facilement être estimée à partir du tracé microdensitométrique. On calcule alors que la quantité de colorant extrainé par μg de RNA est la même quelle que soit la fraction.

D'autre part, si au lieu d'utiliser dans l'ultracentrifugeuse une source de lumière monochromatique, on utilise de la lumière blanche, et que l'on observe soit visuellement, soit à l'aide de photographies en couleur, on remarque que le BET sédimentant avec les acides nucléiques est coloré en violet alors que celui demeurant dans le surnageant est coloré en jaune.

Ceci démontre que non seulement le colorant sédimente avec les AN, mais qu'il forme avec eux un complexe dont les propriétés optiques sont différentes. Toute sédimentation résultant d'une adsorption non spécifique est ainsi exclue.

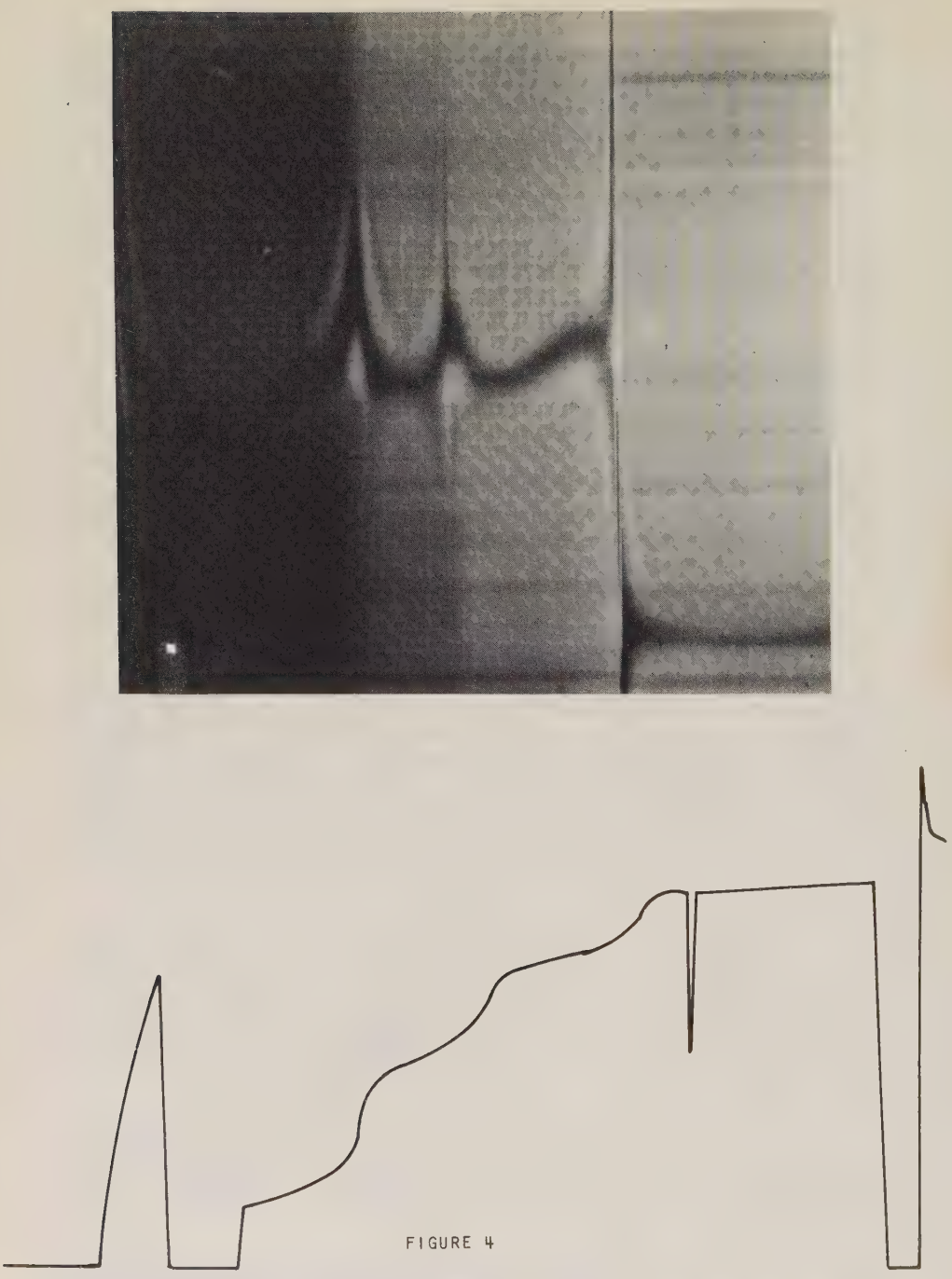


FIGURE 4

Ultracentrifugation d'un mélange BET et de RNA total de foie de rat. La densité optique du cliché obtenu (en haut) avec le système optique Schlieren à 546 mμ est enregistrée.
Le tracé microdensitométrique est représenté en bas.
La concentration de RNA est de 0,8 mg/ml, celle de BET de 0,2 mg/ml.
La composition saline de la solution est :
NaCl 0,1 M - Tris HCl 0,1 M - pH 7,5

*3°– Spectrofluorimétrie*

Par cette méthode la démonstration d'une interaction se fait en mettant en évidence des variations de l'intensité de fluorescence émise par le colorant et par la mesure du taux de polarisation de la lumière fluorescente.

- variation de l'intensité de fluorescence

Quant à une solution de BET, de concentration donnée, on ajoute des concentrations croissantes de DNA ou de RNA, on observe une augmentation importante de la fluorescence du BET. Pour de faibles concentrations en AN, la fluorescence augmente linéairement avec la concentration en AN. Lorsque l'on atteint des concentrations élevées d'AN, la fluorescence tend vers une limite (figure 9). *Le rapport V* entre l'intensité de fluorescence à cette limite et l'intensité de fluorescence du BET libre varie avec la longueur d'onde de la lumière excitatrice. Ceci apparait sur la figure 5 représentant le spectre d'excitation (non corrigé des variations spectrales d'énergie de la lampe fournissant la lumière excitatrice) du BET libre et du BET en présence d'un grand excès de DNA et de RNA; V est minimal pour la longueur d'onde de 420 mμ (V = 3) et maximal pour deux longueurs d'onde $\lambda_{ex}$ = 550 mμ (V = 57 pour le DNA et V = 63 pour le RNA à 20°C) $\lambda_{ex}$ = 360 mμ (V = 80 pour le DNA et V = 100 pour le RNA à 20°C).

Le maximum du spectre d'émission reste inchangé et égal à $\lambda_{em}$ = 590 mμ (figure 6).

Ces faits et en particulier le parallélisme entre les déplacements des maxima du spectre d'excitation de fluorescence et d'absorption suggèrent qu'aux deux formes colorées distinctes correspondant au BET libre et au BET fixé, correspondent deux états différant par leur rendement de fluorescence, le BET fixé ayant un rendement beaucoup plus élevé.

- mesure du taux de polarisation de la lumière fluorescente

Lorsqu'on ajoute du DNA à une solution de BET, on voit le taux de polarisation de la lumière fluorescente émise par le BET passer d'une valeur nulle à une valeur au maximum égale à 0,17 environ comme le montre la figure 7. Le taux de polarisation augmente avec la concentration de DNA de la même façon que l'intensité de fluorescence. Ceci démontre bien que la liaison du colorant avec le DNA est bien rigide et que l'augmentation de la fluorescence observée lorsque l'on ajoute du DNA résulte bien de cette fixation.

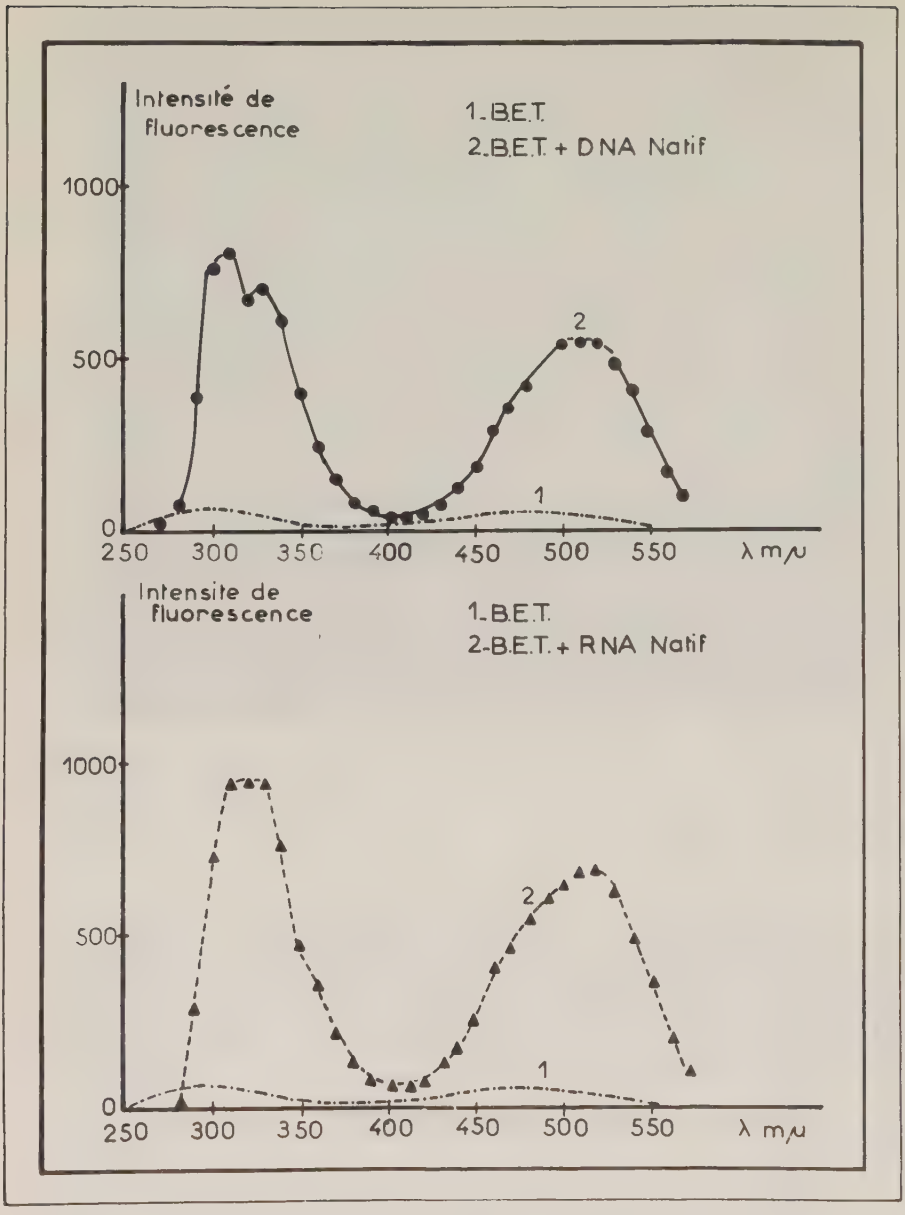



FIGURE 5

Spectre d'excitation de fluorescence comparé du BET pur et du BET en présence de DNA ou de RNA.

La longueur d'onde émettrice $\lambda_{em}$ = 590 mμ

La concentration de BET est partout égale à 7,5 μg/ml.

La concentration de DNA est 350 μg/ml, la concentration de RNA est 500 μg/ml.

La composition saline des solutions est :
NaCl 0,1 M, Tris HCl 0,1 M, pH 7,5

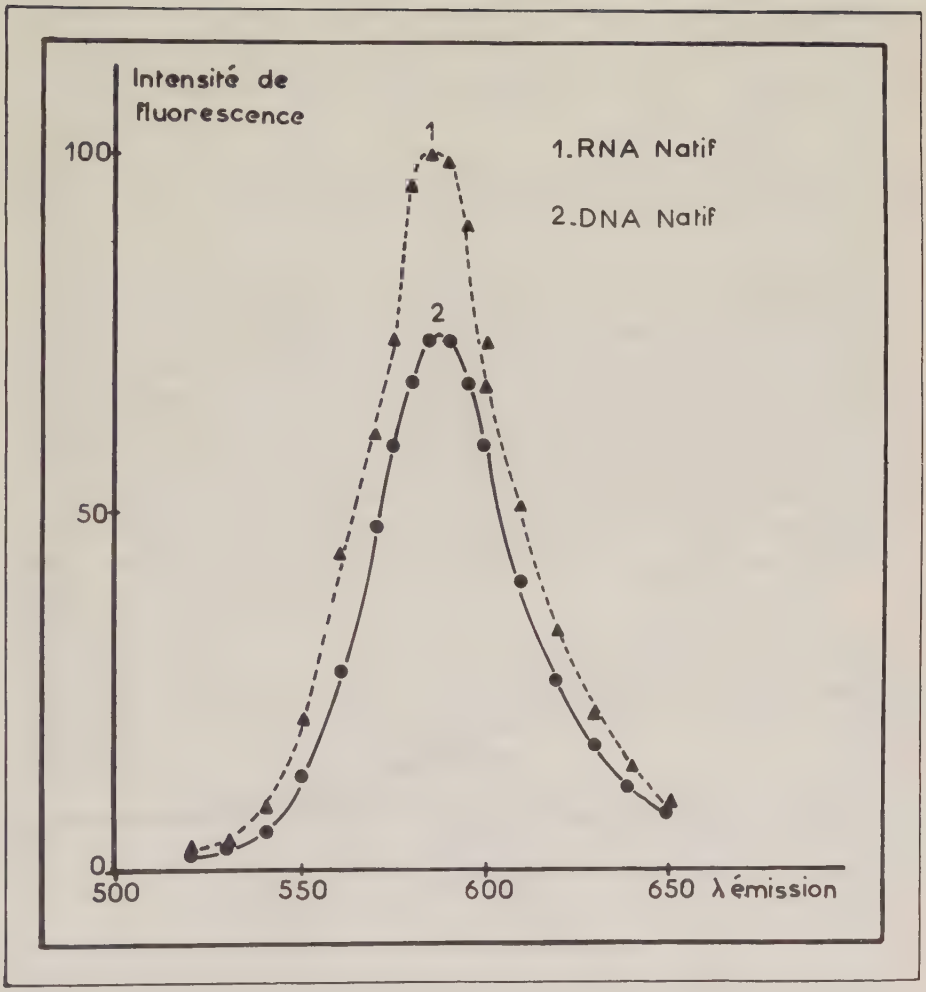



FIGURE 6

Spectre d'émission du BET fixé sur le RNA ou le DNA.

La longueur d'onde excitatrice est 360 mμ et le maximum d'intensité dans le cas du RNA est pris arbitrairement égal à 100. Les autres conditions expérimentales sont identiques à celles de la figure 5.

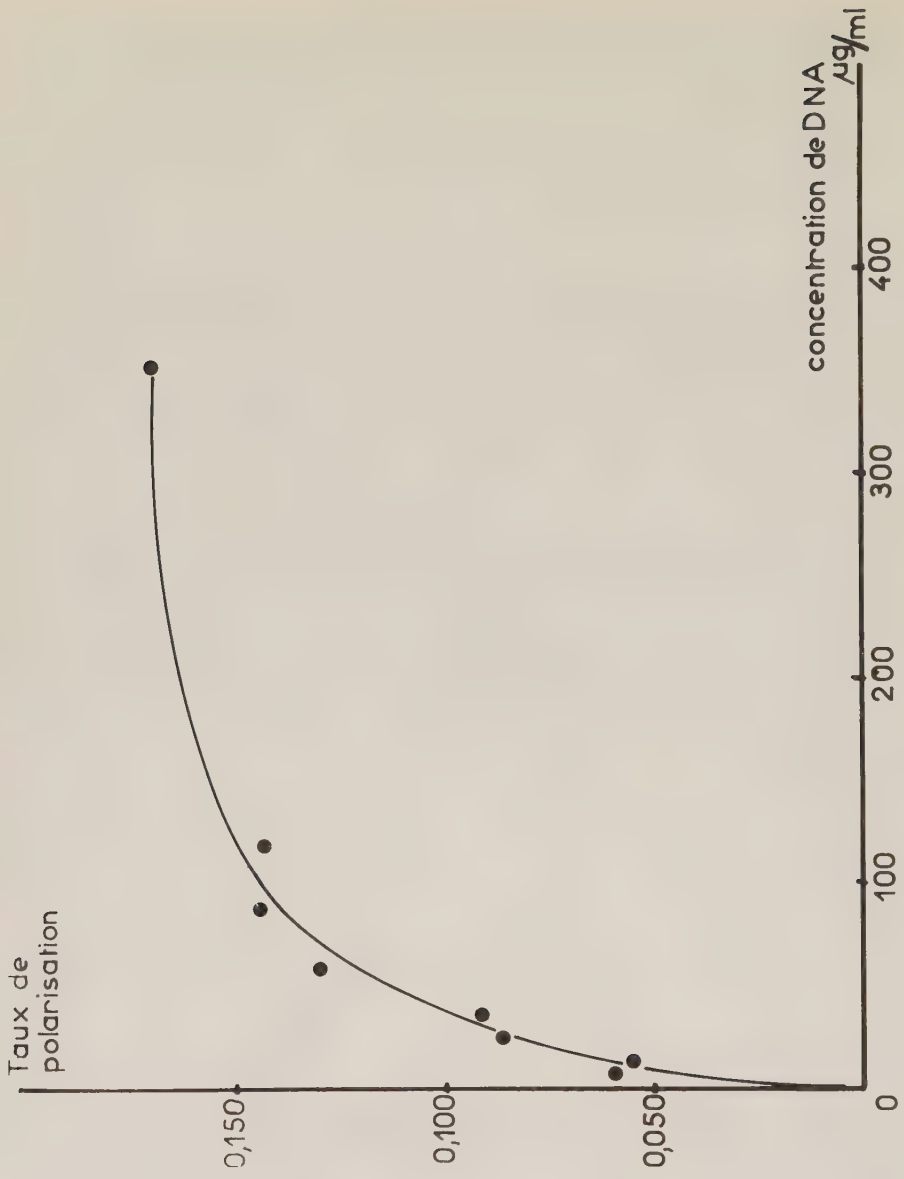



FIGURE 7

Variation du taux de polarisation de la lumière fluorescente émise par le BET en présence de concentration croissante de DNA.

La concentration de BET reste constante et égale à 7,5 µg/ml.

La composition saline des solutions est :
NaCl 0,1 M. Tris HCl 0,1 M. pH 7,5.

La longueur d'onde excitatrice est $\lambda_{ex}$ = 360 mµ

La longueur d'onde émettrice est $\lambda_{ex}$ = 590 mµ

## B - ETUDE DES MODALITES DE L'INTERACTION

A partir de l'instant où l'interaction du BET avec les AN est démontrée et que cette très grande variation de fluorescence du BET lors de sa fixation sur les AN a été observée, les problèmes à résoudre sont au moins de trois ordres.

a) quels sont les facteurs physico-chimiques susceptibles d'agir sur l'interaction avec les AN, et quel est le mécanisme de cette intéraction.

b) quelles sont les raisons de cette augmentation de fluorescence.

c) l'intéraction est-elle spécifique des AN. D'autres substances d'origine biologique sont elles capables de fixer le BET ?

Dans ce chapitre nous étudierons les deux premiers problèmes, le troisième problème sera étudié dans la dernière partie de ce travail. Ce chapitre sera donc divisé en deux parties ; dans une première partie, après avoir montré comment il était possible d'étudier par spectrofluorimétrie la fixation du BET sur les AN, nous exposerons les résultats expérimentaux de l'étude faite par fluorimétrie de la réaction de fixation du BET sur les AN. Il sera montré que c'est une réaction d'équilibre. Les caractéristiques de cet équilibre seront déterminées ainsi que les différents facteurs pouvant le déplacer.

Dans une seconde partie, seront présentés différents résultats expérimentaux qui serviront à essayer d'expliquer pourquoi la fluorescence du BET augmente lorsqu'il se fixe sur les acides nucléiques. Pour cela seront étudiées :

- la fluorescence du BET dans les solvants organiques.
- la fixation des dérivés de structure chimique voisine du BET, afin de déterminer si la fixation sur les AN avec augmentation de fluorescence est une propriété générale de cette série chimique.
- la fixation du BET sur un polymère synthétique, le polyvinylsulfate (PVS).

### *I - Etude par spectrofluorimétrie de la fixation du BET sur les AN.*

Pour étudier quantitativement la fixation du BET sur les AN, il suffit, de pouvoir mesurer la proportion de colorant fixé et de colorant libre. Etant donnée la sensibilité et la précision des mesures fluorimétriques, nous avons établi une méthode spectrofluorimétrique, pour réaliser cette étude, que nous exposerons maintenant.

Soit une solution de BET pur, l'intensité de fluorescence émise par cette solution $I_0$ est proportionnelle à sa concentration $c_0$, ($C_0 < 40$ µg/ml)

$$I_0 = k\, c_0 \quad (1)$$

Lorsqu'on ajoute à cette solution une certaine quantité d'acides nucléiques, l'intensité de fluorescence augmente, l'intensité émise alors, $I_1$, est la somme de l'intensité de fluorescence émise par le BET fixé, $I_f$, à la concentration $c_f$ dans la solution, et de l'entensité émise par le BET demeuré libre, $I_l$, à la concentration $c_1$.

$$I_1 = I_f + I_l \quad (2)$$

$$c_0 = c_f + c_l \quad (3)$$

Soit V le rapport entre l'intensité émise par le BET fixé et le BET libre, $I_f/V$ représente l'intensité de fluorescence émise par une solution de BET libre de concentration $c_f$. Le rapport entre $I_f/V$ et $c_f$ est donc le même qu'entre $I_0$ et $c_0$, on a donc :

$$\frac{I_f}{V} = k\, c_f \quad (4)$$

$$I_0 = \frac{I_f}{V} + I_l \quad (5)$$

$$I_0 = \frac{I_f}{V} + I_1 - I_f \quad (6)$$

$$\frac{I_f}{V} = \frac{I_1 - I_0}{(1 - 1/V)} \quad (7)$$

$$c_f = \frac{I_f}{V \times k} = \frac{I_1 - I_0}{(1-1/V)} \times \frac{1}{Vk} \quad (8)$$

Ici comme 1/V est petit devant 1 on peut écrire :

$$c_f = \frac{I_1 - I_0}{V\, k} \quad (9)$$

V est facilement mesuré. Il suffit de faire le rapport entre l'intensité de fluorescence émise par une solution de BET en présence d'un large excès d'AN et l'intensité de fluorescence d'une solution de BET pur à la même concentration.

*– Présentation des résultats*

Les lois des réactions d'équilibre appliquées au cas de petites molécules se fixant reversiblement sur un polymère ayant n sites récepteurs équivalents conduisent à l'équation de SCATCHARD (59) (15) (75)

$$\frac{r}{c} = k_a n - k_a r \quad (10)$$

ou $k_a$ est la constante intrinsèque d'association.

r le nombre de petites molécules liées par monomère lorsque la concentration en petites molécules libres est c.
La fonction $\frac{r}{c}$ en fonction de r est donc une droite dont la pente est égale à $k_a$ et qui coupe l'axe des abcisses au point d'abcisse n, cette représentation permet de calculer aisément à partir des résultats expérimentaux le nombre de sites disponibles ainsi que la constante intrinsèque d'association. Cette représentation sera utilisée pour étudier l'équilibre entre le BET et les acides nucléiques.
r est facilement calculé expérimentalement en divisant le nombre de moles de BET fixé déterminé comme il a été indiqué précédemment par le nombre de moles de nucléotides dans le milieu. La concentration libre est immédiatement obtenue dès que la concentration fixée est déterminée.

Pour évaluer rapidement l'effet de facteurs physico-chimiques sur la fixation du BET, il est également possible d'utiliser seulement la mesure de $I_1 - I_0$ qui est directement proportionnelle à la concentration fixée $c_f$.

Une variation dans l'intensité de fluorescence émise par un mélange de BET et d'AN sous l'effet d'un facteur physico-chimique pourra résulter de trois facteurs, une variation éventuelle du coefficient V, une variation de la constante intrinsèque d'association apparente du BET pour l'AN, une variation du nombre de sites disponibles. Chaque fois que l'on aura à étudier un facteur pouvant intervenir, ces trois valeurs devront être déterminées.

*Résultats :*

La figure 8 montre la représentation de SCATCHARD traduisant la fixation sur le DNA de thymus de veau et le RNA total de foie de rat.

On constate :

1°) que cette représentation est linéaire
2°) que le nombre disponible total de sites pour le DNA est de 1 site pour 5 nucléotides environ, et de 1 pour 10 dans le cas du RNA.
3°) que l'affinité pour le RNA est plus élevée que pour le DNA.

Nous étudierons maintenant quels sont les facteurs pouvant influencer cet équilibre.

*Effet de la nature et de la concentration des sels*

La figure 9 montre que lorsque la concentration en sel augmente la quantité de DNA nécessaire pour fixer tout le BET est plus élevée mais que le rapport V n'est pas modifié. La quantité de BET fixé reste donc proportionnelle à l'augmentation de fluorescence observée ($I_1 - I_0$) quelleque soit la concentration saline.

La figure 10 montre l'augmentationde l'intensité de fluorescence du BET en présence d'une quantité déterminée de DNA en fonction de la concentration saline et pour différents sels. Les résultats peuvent être groupés en deux familles, les uns correspondant aux ions monovalents, les autres aux ions bivalents. Dans les deux cas on observe qu'au delà d'une certaine concentration saline, la fixation du BET sur le DNA reste constante. Un résultat identique est obtenu avec le RNA. Si l'on détermine la fonction $r/c = f(r)$ pour différentes concentrations salines toutes les droites obtenues coupent l'axe des abcisses au même point, pour les ions monovalents et bivalents. Seules les pentes de ces droites varient mettant en évidence une variation des constantes apparentes intrinsèques de dissociation. La valeur de ces constantes est donnée par le tableau II.

*Effet du pH*

Le tableau III montre que dans le domaine des pH ou les molécules de DNA et RNA sont stables, la variation de l'intensité de fluorescence avec le pH est faible, mais que dans le domaine ou les AN sont dénaturés l'augmentation de la fluorescence est très faible.

*Influence de la structure des AN*

– *Influence du degré de polymérisation*

Le tableau IV montre quelles sont les variations de l'intensité de fluorescence du BET fixé sur du DNA dégradé mécaniquement. On remarquera qu'une dégradation notable n'ayant pas entrainé d'hyperchromicité du DNA (23 S à 14,7 S) n'entraine pas de changement de fixation. Pour en observer, une dégradation importante est nécessaire ($s < 10$ S).

Toutefois la différence d'intensité de fluorescence n'est vraiment notable que lorsqu'une hyperchromicité du DNA, traduisant une dénaturation partielle, est observée.

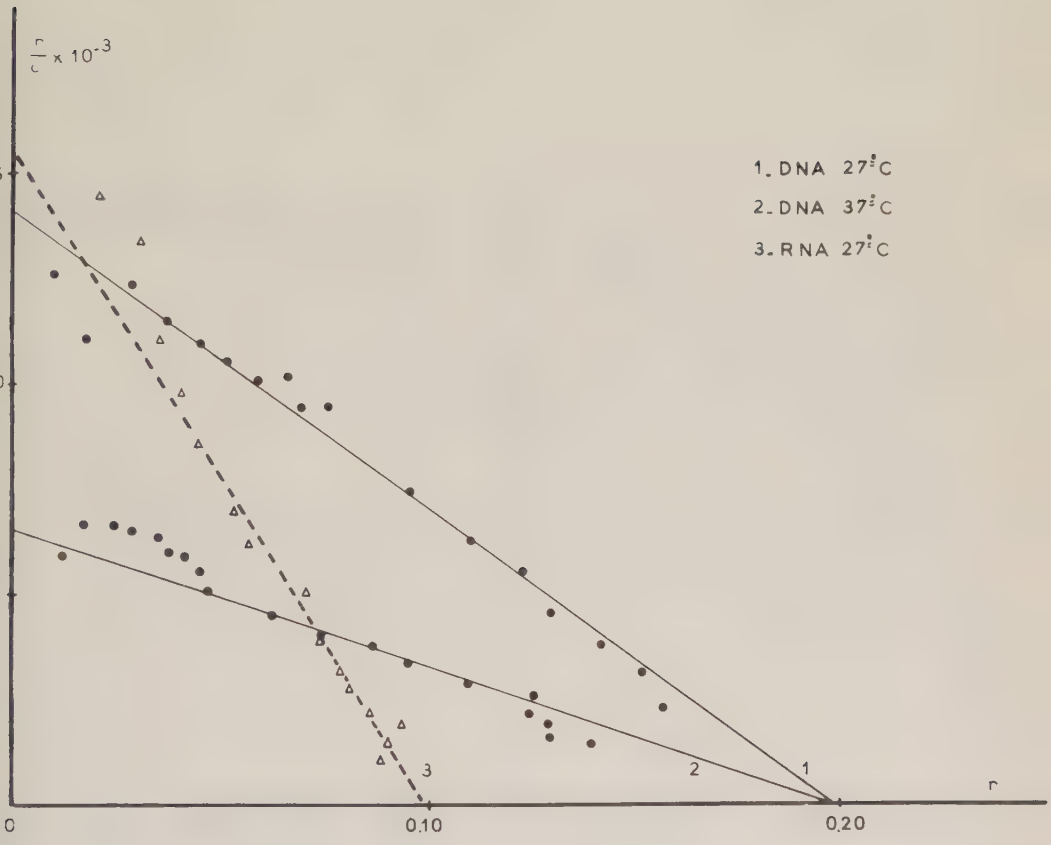



FIGURE 8

Etude de l'équilibre BET-acide nucléique, représentation de Scatchard.
La concentration de DNA est 8 µg/ml (1 et 2)
La concentration de RNA est 15 µg/ml (3)
La composition saline des solutions est partout :
ClNa M, Tris HCl 0,1 M pH 7,5
Les constantes intrinsèques apparentes de dissociation sont égales à
1°) $K_D = 1,4\ 10^{-5}$M 2°) $K_D = 3,10^{-5}$ M 3°) $K_D = 0,65\ 10^{-5}$M

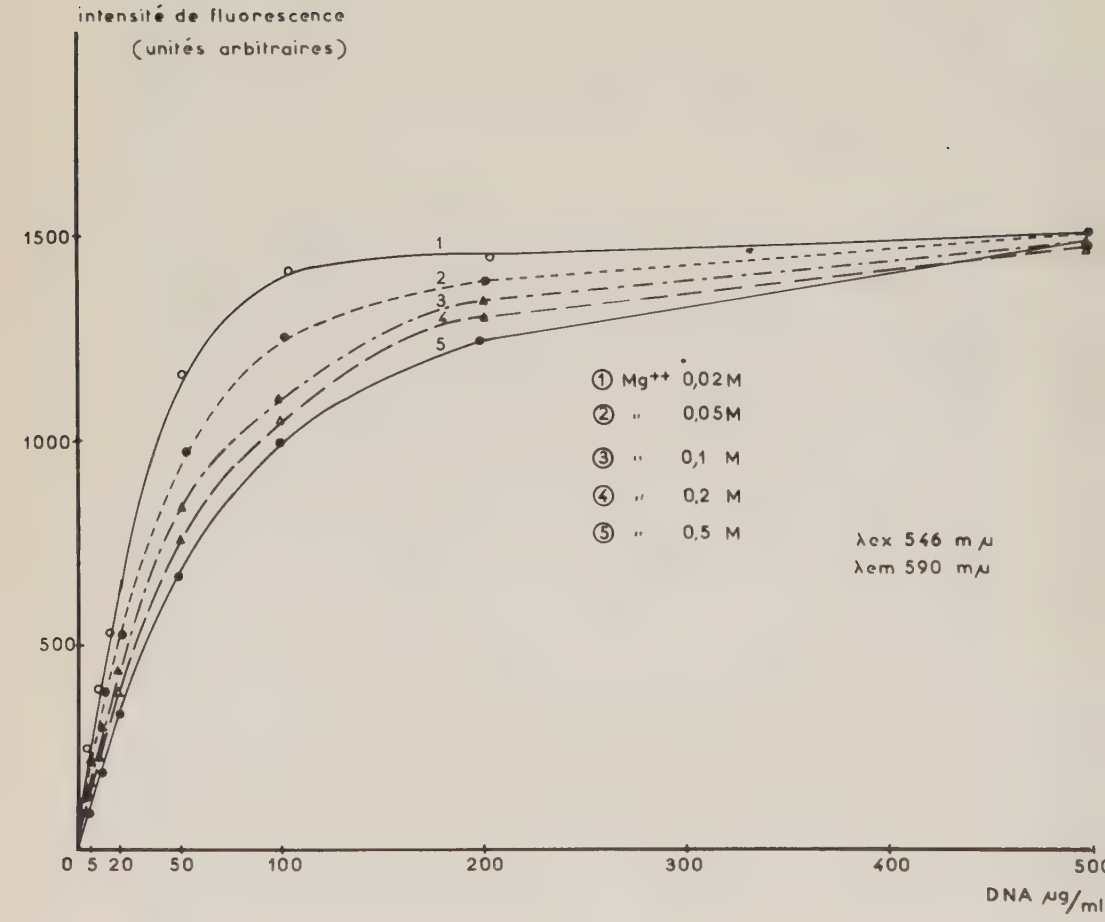



FIGURE 9

Effet du magnésium sur la fixation du BET par le DNA.
L'augmentation de la fluorescence du BET en fonction de la concentration en DNA est mesurée en présence de plusieurs concentrations de Mg.
La composition saline des solutions est : Tris HCl 0,1 M pH 7,5 NaCl 0,01 M.
La concentration en BET est de 7,5 µg/ml.

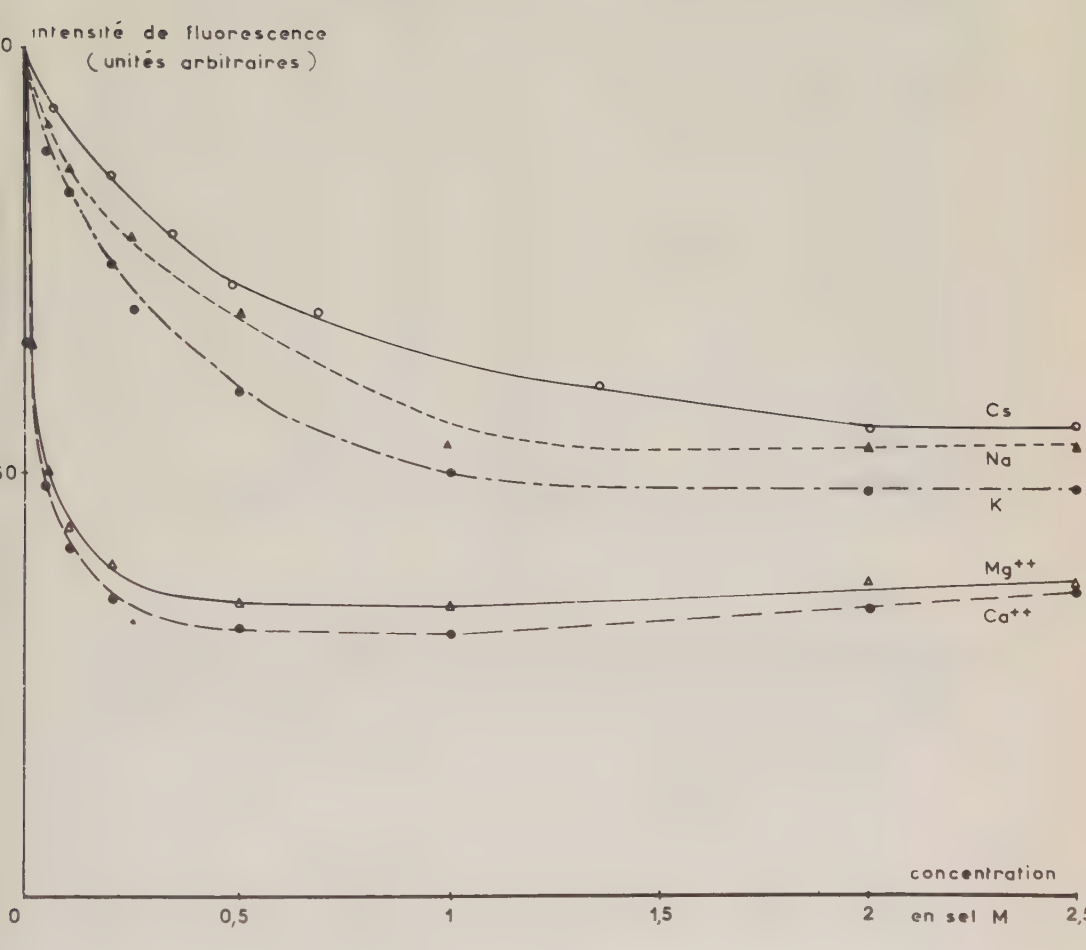



FIGURE 10

Effet de la nature et de la concentration en sel sur la fixation du BET par DNA.

La concentration en BET est 7,5 µg/ml, celle en DNA est 20 µg/ml. La composition saline de la solution est Tris HCl 0,08 M pH 7,5. Le $Ba^{++}Zn^{++}$, $Mn^{++}$ donnent un résultat identique à ceux obtenus pour le $Mg^{++}$ et le $Ca^{++}$. Le $Hg^{++}$ donne un résultat comparable pour les faibles valeurs de la concentration. Mais dès que le rapport Hg/DNA devient élevé on observe une diminution brusque de la fluorescence accompagnée de précipitation.

| Concentration saline | $K_D$ | |
|---|---|---|
| | 37°C | 23°C |
| Tris 0,025 M HCl pH 7,5<br>NaCl 0,075 M | $4\ 10^{-7}$ | $4\ 10^{-7}$ M |
| Tris 0,025 M HCl pH 7,5<br>NaCl 0,040 M | $4\ 10^{-7}$ | $7\ 10^{-7}$ M |
| Tris 0,025 M HCl pH 7,5<br>NaCl 0,09 M | $2,3\ 10^{-7}$ | $1,5\ 10^{-6}$ M |
| Tris 0,025 M HCl pH 7,5<br>NaCl 0,50 MM | $1,1\ 10^{-5}$ | $7,3\ 10^{-6}$ M |
| Tris 0,025 M HCl pH 7,5<br>NaCl 1 M | $3\ 10^{-5}$ | $1,2\ 10^{-5}$ M |
| Tris 0,025 M HCl pH 7,5<br>$MgCl_2$ 0,5 N | - | $4\ 10^{-5}$ M |

TABLEAU II

Effet de la concentration saline sur la constant intrinsèque apparente de dissociation $K_D$ à t = 23°C et 37°C pour le DNA de thymus de veau.

| DNA | | RNA | |
|---|---|---|---|
| pH mesuré | % Augmentation intensité de fluorescence | pH mesuré | % Augmentation intensité de fluorescence |
| 2,1 | 0 | 2,1 | 3,8 |
| 2,7 | 0 | 3,2 | 43 |
| 3,2 | 74 | 3,9 | 76 |
| 3,9 | 77 | 4,8 | 90 |
| 4,9 | 85 | 5,8 | 91 |
| 5,8 | 90 | 7,4 | 100 |
| 6,8 | 93 | 9,08 | 100 |
| 7,7 | 93 | 10,4 | 100 |
| 7,8 | 96 | 11,9 | 4 |
| 9,0 | 100 | 12,1 | 0,7 |
| 9,5 | 100 | | |
| 10,5 | 100 | | |
| 11,7 | 63 | | |
| 11,8 | 5,1 | | |

TABLEAU III

Variation de l'intensité de fluorescence des complexes DNA-BET et RNA-BET avec le pH.

Les tampons utilisés sont : glycocolle - HCl 2,1 - 3,2
acétate 3,9 - 4,9
phosphate 5,8 - 6,8
Tris-HCl 6,8 - 7,8
carbonate 9 - 10,5

Au delà, le pH est ajusté avec de la soude

Tous les tampons sont employés à la même concentration 0,05 M.

La concentration de BET est 7,5 µg/ml. La concentration en DNA est de 5 µg/ml, celle de RNA 14 µg/ml.

Les valeurs n'ont pas été corrigées des variations de force ionique dues au changement du pH des tampons.

1 - Turrax (DNA utilisé F. 12)

| Temps d'action | Densité optique initiale de la solution a 260mμ | Constante de sédimentation s20°C (Svedberg) | PM | % Intensité de fluorescence initiale |
|---|---|---|---|---|
| 0 sec | 1.300 | 23 | $8\ 10^6$ | 100 |
| 2 sec | 1.300 | 14,7 | $2,5 10^6$ | 100 |
| 16 sec | 1.300 | 13,3 | $2\ 10^6$ | 100 |
| 64 sec | 1.300 | 12,6 | $1,6 10^6$ | 94 |

2 - Ultrasons (DNA utilisé F. 15)

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 0 sec | 1.240 | 17 | $3,6 10^6$ | 100 |
| 15 sec | 1.240 | 16,8 | $3,4 10^6$ | 100 |
| 10 min | 1.240 | 10,1 | $9\ 10^5$ | 96 |
| 30 min | 1.230 | 8,5 | $5,6 10^5$ | 85 |
| 60 min | 1.380 | 4,4 | $3,2 10^5$ | 83 |

TABLEAU IV

Etude par fluorescence de la variation de la fixation du BET sur le DNA dégradé mécaniquement : 1°) par le Turrax
2°) par les ultrasons
La composition saline de la solution est NaCl 0,1 M, Tris HCl 0,1 M pH 7,5
Le poids moléculaire est calculé à partir de la relation de DOTY et al (12)
$s = 0,063\ M^{0,37}$.

Dans le cas du RNA on peut comparer la fixation sur les différentes fractions que l'on peut séparer en gradient de saccharose. On observe alors que les trois fractions du RNA de foie de rat 27 S, 16 S et 4 S fixent également le BET. Nous avions trouvé en ultracentrifugation analytique un résultat identique.

Les nucléotides ainsi que le RNA et le DNA hydrolysés par les nucléases ne provoquent qu'une augmentation très faible de la fluorescence du BET comme on peut le voir sur le tableau XIV page 81.

*– Influence de la composition en base des DNA*

Le facteur V, les constantes intrinsèques de dissociation ainsi que le nombre total de sites disponibles ont été trouvés rigoureusement identiques pour les DNA de thymus de veau, de micrococcus lysodeikticus, pseudomonas aeruginosa et de E. coli.

Pour le poly dAT synthétique le facteur V n'a pu être mesuré par manque de matériel. Si l'on considère que V est le même que pour le DNA de thymus de veau, on trouve que la constante apparente intrinsèque de dissociation est la même que pour le DNA de thymus, mais que le nombre total de sites disponibles apparents sur la molécule est supérieur et égal à environ 1 site pour 4 nucléotides. Autrement dit le poly AT provoque à concentration égale une augmentation de fluorescence du BET supérieure à celle produite par le DNA de thymus. Ce phénomène peut résulter soit d'une augmentation du facteur V, soit d'une augmentation du nombre de sites.

*– Influence de la structure secondaire des acides nucléiques*

Pour étudier l'influence de la structure secondaire sur la fixation du BET sur les AN et l'augmentation de fluorescence qui en résulte, l'idéal est de comparer la réaction du BET avec des structures à deux brins et à un brin. Si les structures à deux brins sont bien définies, les structures à un brin le sont beaucoup moins. En effet, ces structures sont capables par endroit de former en se repliant sur elles-mêmes des structures à deux brins (17) (25). L'exemple type de cette structure est celle formée par le RNA. Toutefois on peut obtenir des structures à un brin sans hybridation interne en chauffant et formolant les AN, avec les polynucléotides synthètiques ne contenant qu'un type de nucléotide en portant les AN dans des milieux de pH extrêmes.

– *DNA chauffés et trempés*

Le tableau V montre quelle est l'augmentation de fluorescence du DNA dénaturé dans ces conditions par rapport au DNA natif.

– *AN chauffés formolés*

Les figures 11 et 12 montrent que l'intensité de fluorescence en présence d'AN ainsi traités est plus faible, V demeure sensiblement identique. Toutefois il n'est pas possible de déterminer si cette différence est liée à une variation du nombre de sites ou de l'affinité car cette détermination nécessiterait d'augmenter la concentration en BET et dans ces conditions il se forme un complexe qui précipite.

– *DNA de Ø × 174*

L'augmentation de fluorescence provoquée par le DNA de Ø × 174 est montrée sur le tableau VI. Toutefois étant donnée la petite quantité de matériel dont nous avons pu disposer, nous n'avons pas été en mesure de déterminer si la diminution de fluorescence observée était reliée à une variation du facteur V ou à une variation du nombre total de sites disponibles ou une variation de la constante intrinsèque d'association.

– *Polyribonucléotides*

Le tableau VII montre quelle est l'augmentation de fluorescence du BET provoquée par les polyribonucléotides natifs et formolés chauffés. On remarquera :

1°) V est égal à environ 10 pour le poly A formolé chauffé

2°) que les polyribonucléotides natifs ont très peu d'effet sur la fluorescence du BET par comparaison au RNA natif.

3°) que le poly A formolé chauffé contrairement au poly I formolé chauffé a une influence plus grande sur la fluorescence du BET que le poly A natif.

Il sera montré au chapitre 3 page 71 que par contre les polyribonucléotides hybrides à deux brins agissent sur la fluorescence du BET d'une manière comparable au RNA natif.

| | $(I_1 - I_O)$ % |
|---|---|
| DNA natif | 100 |
| DNA chauffé formolé<br>Hyperchromicité 40 % | 44 |
| DNA chauffé<br>Hyperchromicité 30 % | 55 |

TABLEAU V

Comparaison entre l'augmentation de fluorescence du BET provoquée par une même concentration de DNA de thymus de veau natif et dénaturé.
La concentration en AN pour la mesure de fluorescence est 10µg/ml, celle du BET 7,5 µg/ml.
La composition saline des solution est : NaCl 0,01 M, citrate de Na 0,005 M. Tris HCl pH 7,5 0,01 M.

| | $(I_1 - I_O)$ % |
|---|---|
| DNA natif<br>Thymus de veau | 100 |
| RNA natif<br>Foie de rat | 46 |
| DNA Ø × 174 | 42 |

TABLEAU VI

Comparaison entre l'augmentation de fluorescence du BET provoquée par une même concentration de DNA de Ø × 174, de DNA natif de thymus de veau, et de RNA total natif de foie de rat.

La concentration en AN est de 10 µg/ml. Celle de BET (75 µg/ml) est capable de saturer les polynucléotides.

La composition saline du milieu est : NaCl 0,1 M, Tris HCl 0,1 M pH 7,5.

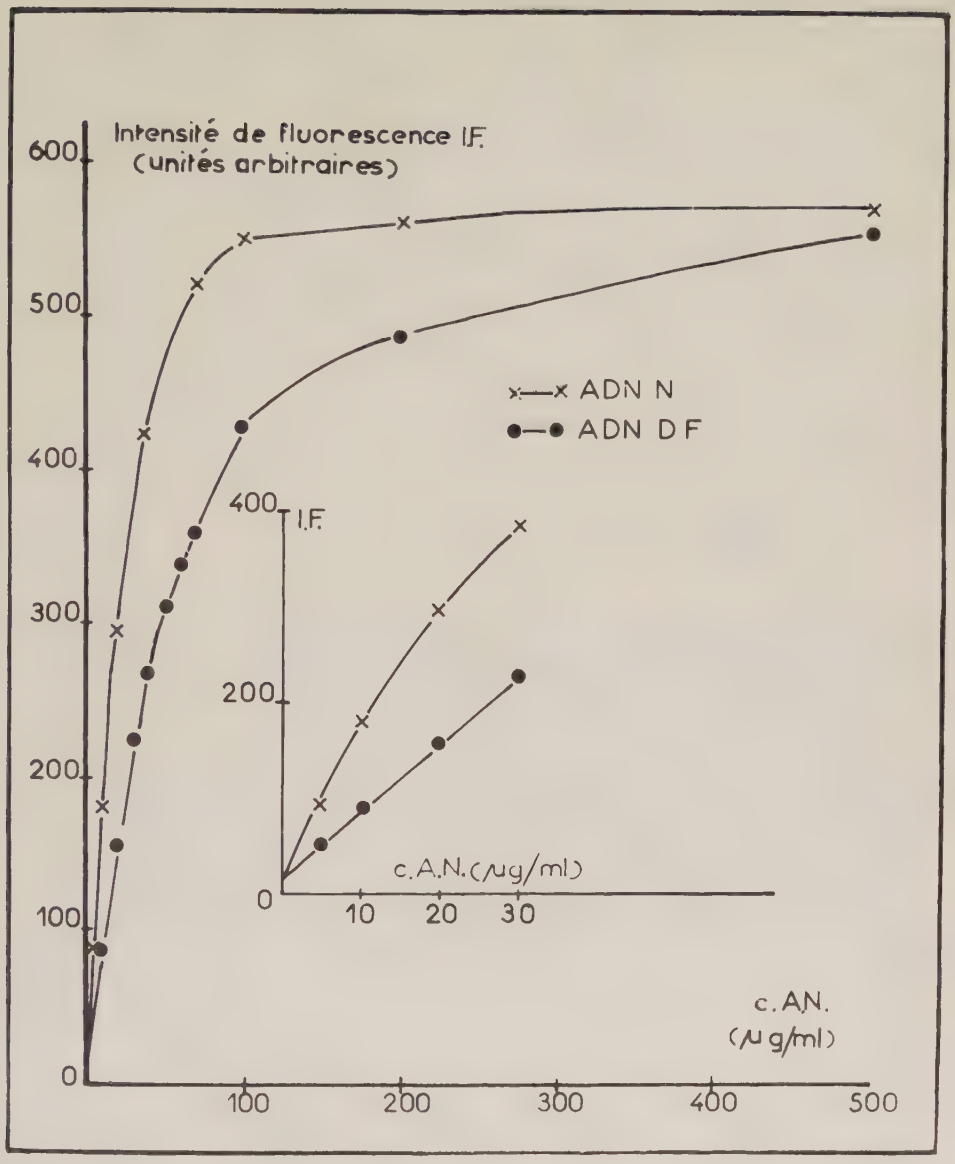



FIGURE 11

Augmentation de la fluorescence du BET provoquée par le DNA natif (N) et le DNA dénaturé formolé (DF).

Les conditions expérimentales sont les mêmes que pour la figure 12. Le DNA est du DNA de thymus de veau.

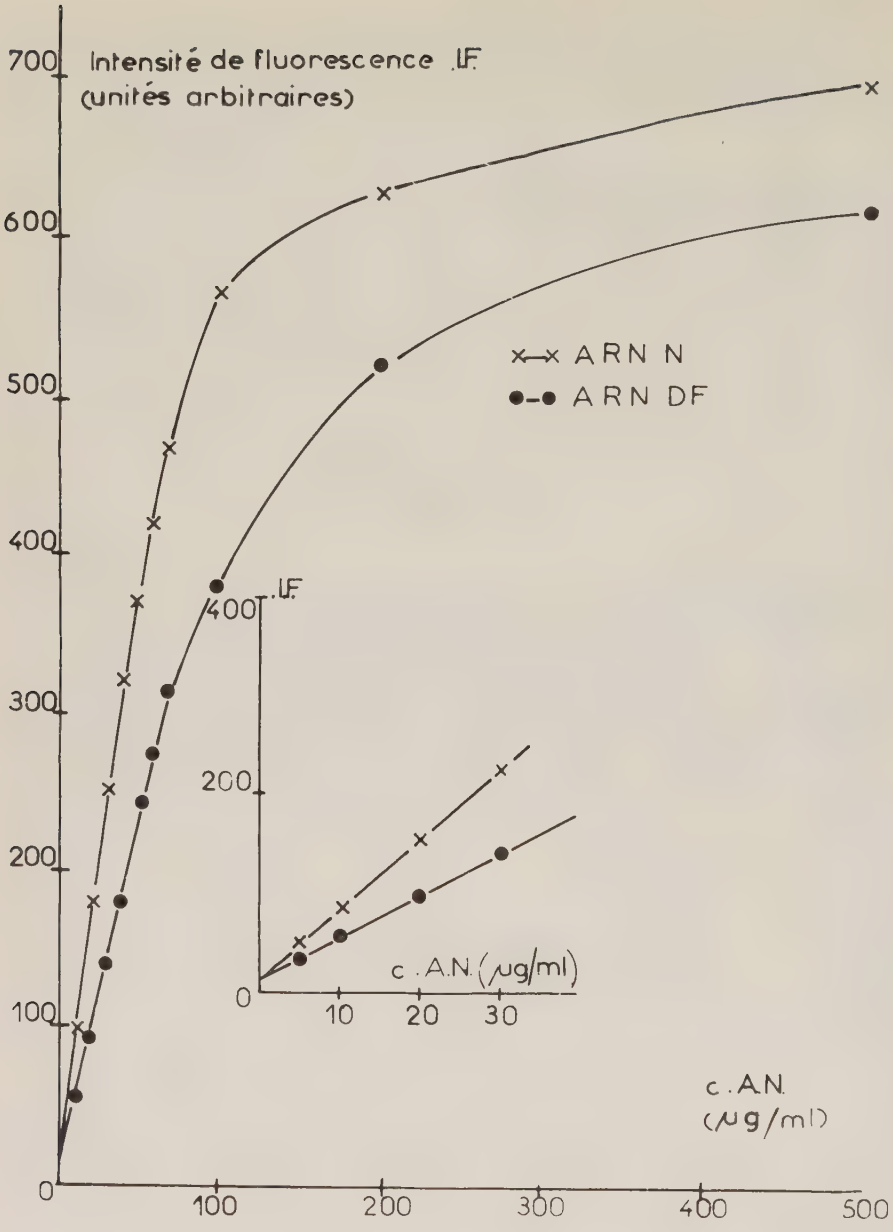



FIGURE 12

Augmentation de fluorescence du BET provoquée par le RNA natif (N) et le RNA dénaturé formolé (DF).
La concentration de BET est 7,5 µg/ml. La composition saline des solutions est Tris HCl 0,1 M pH 7,5, ClNa 0,1 M.
Le RNA est du RNA total de foie de rat. La longueur d'onde d'excitation est 546 mµ celle d'émission 590 mµ.

| µg/ml | Poly A N | Poly A F.C. | Poly I N | Poly I F.C | Poly U N | Poly U F.C | Poly C N | Poly C F.C |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 83 | 10 | 33 | 10 | 7 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| 167 | 20 | 64 | 46 | 14 | 8 | 1,5 | 0,5 | 0,5 |
| 250 | 26 | 84 | 68 | 20 | 9 | 3,5 | 1 | 1 |
| 333 | 34 | 120 | 80 | 26 | 10 | 4,5 | 1 | 1 |
| 420 | 40 | 131 | 98 | 29 | 13 | 5,5 | 1,5 | 1,5 |
| 500 | 45 | 140 | 110 | 32 | 14 | 6,5 | 2 | 2 |
| 580 | 49 | 117 | 115 | 36 | 16 | 8 | 2 | 2 |

TABLEAU VII

Augmentation de la fluorescence ($I_1$ - $I_0$) en fonction de la concentration en nucléotide pour différents polynucléotides natifs (N) et chauffés formolés (F.C.). La concentration en BET est 7,5 µg/ml NaCl 0,1 M tris HCl 0,1 M pH 7,5.

La même quantité de BET fixé sur le RNA aurait donné une augmentation de 850 dans les mêmes conditions de lecture ($\lambda ex546$, $\lambda em590$). L'intensité émise par le BET témoin est, dans ces conditions, de 14.

L'augmentation de fluorescence en présence de 10 µg de RNA aurait été de 450.

- *Influence de la température*

- *DNA*

La figure 8 montre que le nombre total de sites disponibles ne varie pas entre 20 et 37°C. Seules les constantes intrinsèques de dissociation sont affectées, la mesure de la variation de ces constantes en fonction de la température permet de mesurer la variation de l'Enthalpie ainsi que les variations de l'énergie libre et de l'entropie.

On a en effet :

$$\Delta G^\circ = -RT \text{ Log } K_D \qquad (11)$$

$$\Delta S^\circ = \frac{\Delta H^\circ - \Delta G^\circ}{T} \qquad (12)$$

$$\Delta H^\circ = \frac{-R}{(1/T_2 - 1/T_1)} \text{Log } \frac{K_2}{K_1} \qquad (13)$$

Les résultats de ces déterminations sont donnés dans la figure 13.

- *RNA*

Les résultats obtenus avec le RNA sont similaires. Le nombre de sites total ne varie pas avec la température. Les valeurs obtenues pour $\Delta G^\circ$, $\Delta S^\circ$ et $\Delta H^\circ$ sont données dans la légende de la figure 13, dans les mêmes conditions que pour le DNA.

D'autre part, on note que la fluorescence propre du BET libre augmente avec la température, (environ de 12 % entre 23 et 37°C), d'autre part le spectre de la solution de BET change progressivement lorsque la température s'élève. A 95°C le maximum d'absorption est à 490 mμ comme on peut le voir sur la figure 14. Les valeurs d'énergie libre varient avec la force ionique puisque la constante de dissociation apparente varie également ; pour distinguer si cette variation est liée à une variation d'Enthalpie ou d'entropie, les constantes de dissociation ont été déterminées à deux températures 23°C et 37°C à plusieurs concentrations en NaCl. Les résultats sont rapportés sur le tableau II. On note qu'à très faible concentration en sel la constante intrinsèque de dissociation ne varie pas avec la température, la variation d'enthalpie correspondante est donc nulle et la variation d'entropie change de signe et devient importante. L'ensemble des résultats est rapporté sur le tableau V III.

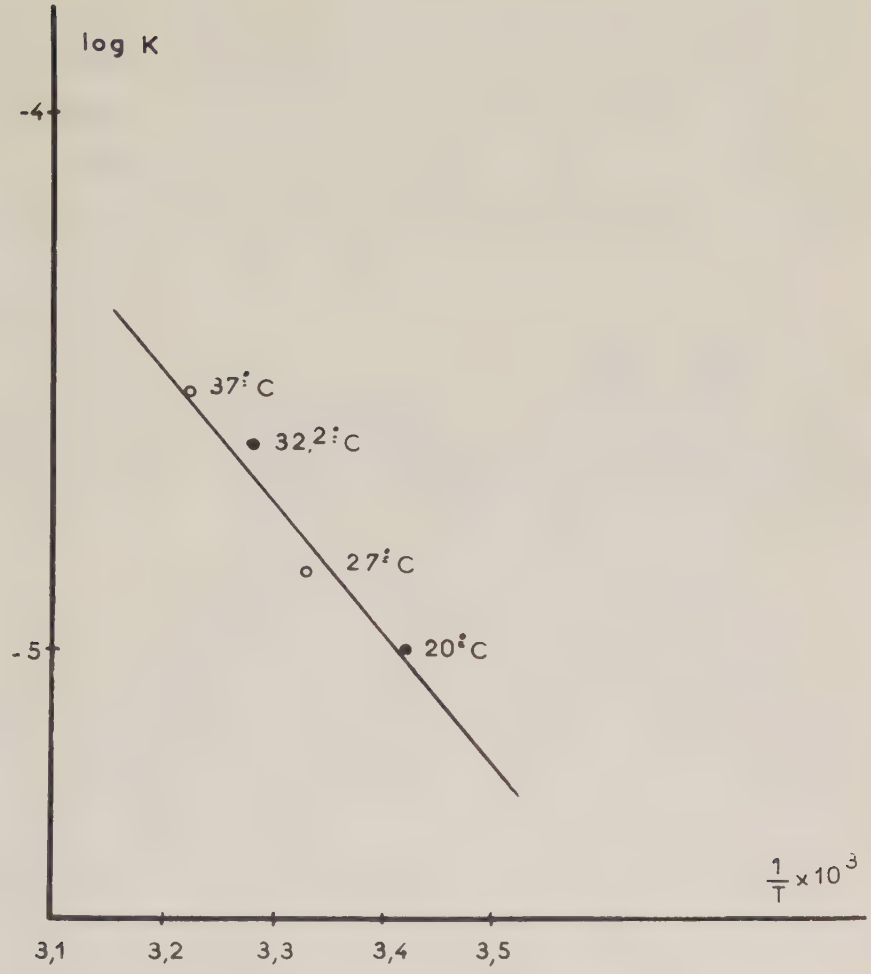



FIGURE 13

Etude de la variation de $K_D$ constante de dissociation intrinsèque en fonction de la température.

Les différentes constantes thermodynamiques qui peuvent être calculées à partir de ces résultats pour la dissociation d'une môle de BET en milieu NaCl M tris HCl pH 7,5 à 20° C sont :

$\Delta H°$ = + 11.000 calories $\Delta G°$ = + 6.700 calories

$\Delta S°$ = + 14,5 u.e.

Les valeurs trouvées dans les mêmes conditions expérimentales pour le RNA sont :

$\Delta H°$=+13.000 calories $\Delta G°$=+6.900 calories $\Delta S°$=+17 u.e.

| c NaCl M | Δ S° | Δ H° | Δ G° |
|---|---|---|---|
| 0,015 | - 29 | ≃ 0 | + 8650 |
| 0,04 | - 28 | ≃ 0 | + 8300 |
| 0,09 | - 8,8 | + 5200 | + 7800 |
| 0,5 | - 6,1 | + 5200 | + 7000 |
| 1 | + 14 | + 11000 | + 6700 |

TABLEAU VIII

Variations de l'énergie libre ($\Delta G°$) de l'entropie ($\Delta S°$) et de l'enthalpie ($\Delta H°$) de la réaction de dissociation du complexe BET-DNA pour différentes concentrations en sel. Les conditions expérimentales sont celles du tableau II.

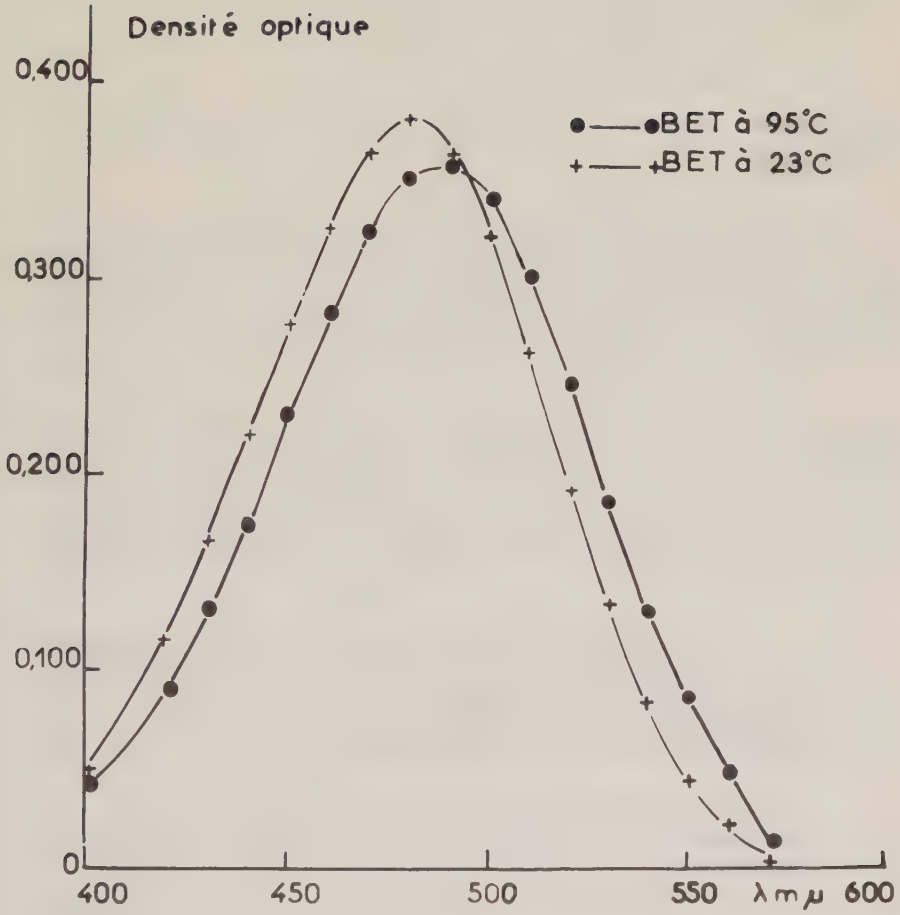



FIGURE 14

Spectre du BET (30 µg/ml dans l'eau) à 23°C et 95°C.

– *Influence de l'urée*

L'urée a d'autant plus d'action sur la fixation du BET sur le DNA que la concentration saline du milieu est plus élevée. Sur la figure 15 sont représentées les fonctions r/c = f(r) pour le DNA témoin et pour le DNA en présence de différentes concentrations d'urée en milieu de force ionique élevée. On remarquera (figure 15) que le nombre de sites disponibles total n'est pas modifié et que seule la constante apparente de dissociation varie, autrement dit qu'un excès de BET est capable de déplacer l'urée. D'autre part, la constante de dissociation augmente très rapidement avec la concentration d'urée dans le milieu.

*Inhibition de la fixation du BET sur le DNA par la quinacrine et l'actinomycine.*

La figure 16 montre qu'en présence de quinacrine la constante intrinsèque apparente de dissociation du BET pour le DNA diminue avec la concentration en quinacrine mais que, un excès de BET étant capable de déplacer la quinacrine, le nombre de sites total apparents disponibles n'est pas modifié.

Par contre, on peut remarquer sur la figure 17 qu'en présence d'actinomycine la constante intrinsèque apparente d'association n'est pas modifiée mais qu'un excès de BET n'étant pas capable de déplacer l'actinomycine, le nombre de sites total apparents disponibles pour le BET diminue lorsque la concentration en actinomycine augmente.

Il est possible de faire une analogie avec l'inhibition enzymatique. Dans ce système le nombre de sites disponibles total est équivalent à la vitesse maximum et la constante de dissociation est équivalente à la constante de MICHAELIS.

Dans le premier cas nous dirons donc que l'inhibition est du type compétitif, et dans le deuxième cas qu'elle est du type non compétitif.

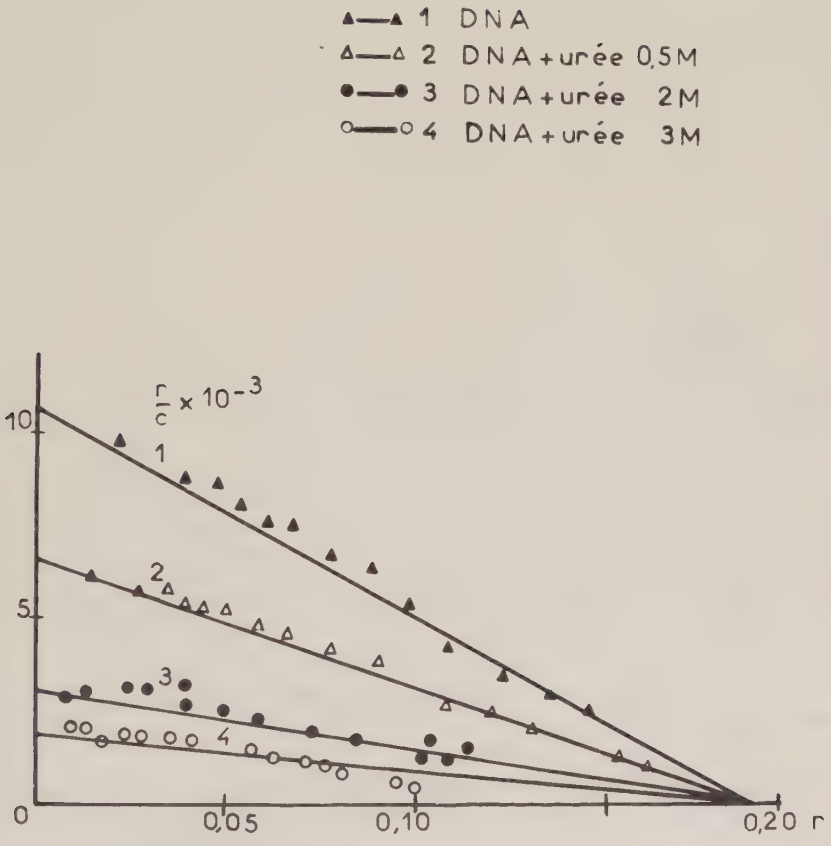



FIGURE 15

Influence de l'urée sur la fixation du BET sur le DNA, représentation de Scatchard.

La concentration saline du milieu est ClNa 1 M, tris HCl 0,1 M pH 7,5.

Les expériences sont faites à 23°C.

Les constantes intrinsèques apparentes de dissociation sont :

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| DNA témoin | 1,7 | $10^{-5}$M | | 3 M | 9,5 | $10^{-5}$M |
| + urée 0,5 M | 2,7 | $10^{-5}$M | | 7 M | 2,5 | $10^{-4}$M |
| 2 M | 6,3 | $10^{-5}$M | | | | |

La constante de dissociation mesurée en présence de $Cl_2Mg$ 0,5M tris HCl 0,1M pH 7,5, urée 7 M est égale à 1 $10^{-3}$ M.

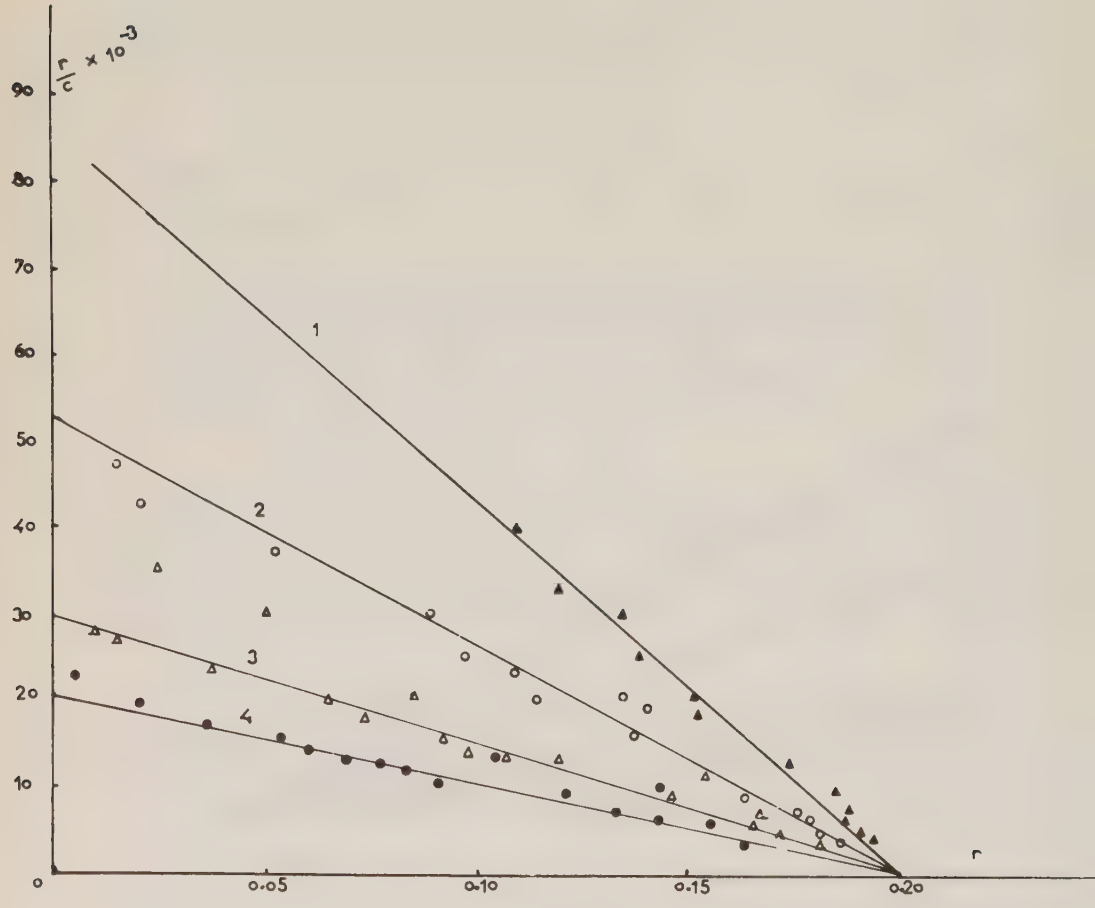



FIGURE 16

Etude de l'inhibition de la fixation du BET sur le DNA par la quinacrine.

Représentation de Scatchard

1° - DNA témoin c = 4 µg/ml

2° - DNA 4 µg/ml + quinacrine 3,2 µg/ml

3° - DNA 4 µg/ml + quinacrine 9,6 µg/ml

4° - DNA 4 µg/ml + quinacrine 15 µg/ml

La composition saline des solutions est: NaCl 0,12M, Tris HCl 0,08 M pH 7,5

La température est de 23°C.

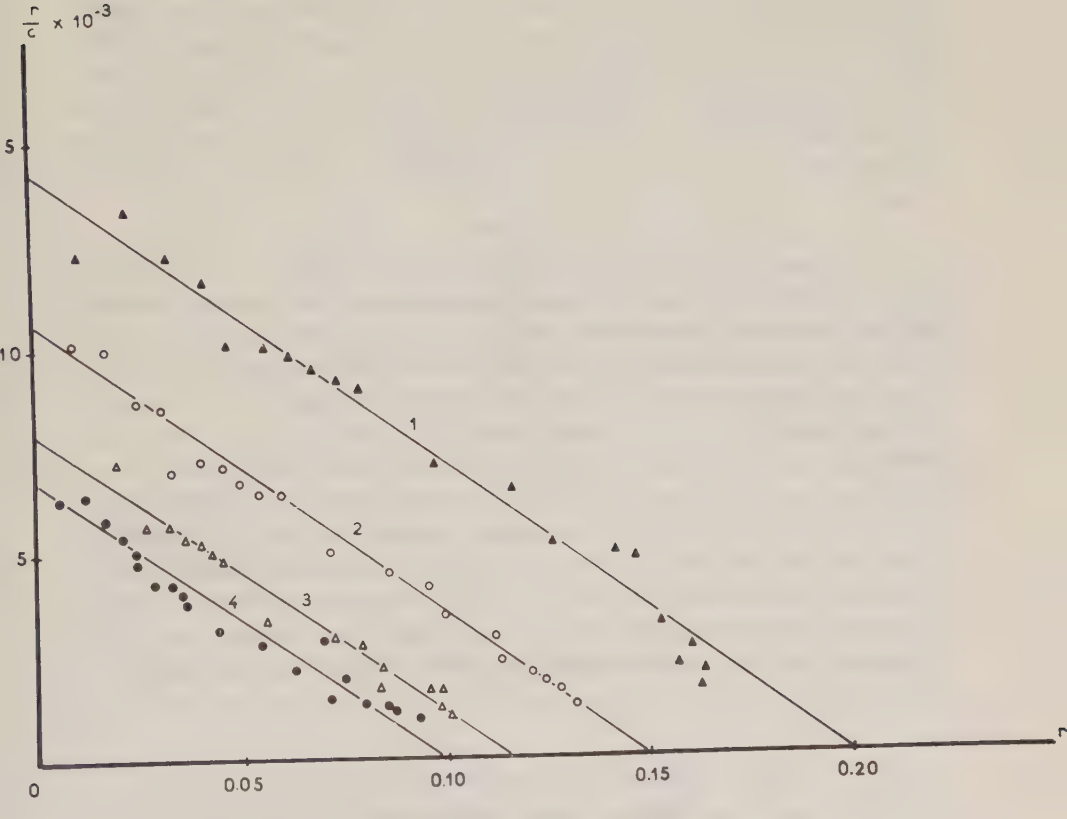



FIGURE 17

Inhibition de la fixation du BET sur le DNA par l'actinomycine.
Représentation de Scatchard.
1°) DNA témoin 4,3 µg/ml
2°) DNA 4,3 µg/ml + Actinomycine 1,6 µg/ml
3°) DNA 4,3 µg/ml + Actinomycine 4 µg/ml
4°) DNA 4,3 µg/ml + Actinomycine 8 µg/ml
La composition saline des solutions est (NaCl M, Tris HCl 0,08 M pH 7,5)
La température est de 27°C.

*Etude des causes responsables de l'augmentation de la fluorescence du BET lors de sa fixation sur les acides nucléiques.*

Il avait déjà été observé pour deux corps, la berberine (76) et l'auramine (51) une augmentation de fluorescence lorsque ces corps se fixent sur le DNA. Une augmentation de fluorescence a également été observée lorsque certains corps se fixent sur des polymères synthétiques (1) et sur les protéines (1). Une explication a été avancée pour expliquer ce phénomène dans un cas par OSTER et al. (52)(1) Selon cet auteur l'augmentation du rendement de fluorescence lors de la fixation d'un colorant possèdant un radical phenyl sur un polymère serait du à la suppression de la libre rotation du radical phényl à l'état fixé, libre rotation qui assurerait en solution la désactivation de la molécule. Dans ce cas une augmentation de la viscosité du milieu, qui diminue la libre rotation du radical phényl, doit augmenter la fluorescence du colorant.

Dans le cas du BET une telle explication pourrait très bien être avancée puisque le colorant possède un radical phenyl. Mais de nombreux faits et en particulier le fait que la fluorescence du BET dans un gel d'agar de viscosité macroscopique très élevée ne varie pas et que la fluorescence du BET en solution aqueuse augmente avec la température et certains faits que nous exposerons maintenant nous ont suggéré une autre interprétation.

Il est d'ailleurs probable que ce facteur, la libre rotation du radical phényl, doit intervenir également dans l'augmentation de la fluorescence du BET fixé sur les AN, car la probabilité de conversion interne, à laquelle est liée le rendement de fluorescence, (54) est considérablement plus élevée lorsque le BET est libre en solution aqueuse que lorsqu'il est lié sur le DNA.

- *Fluorescence du BET en milieu non aqueux*

Le BET se dissout dans les solvants tels que les alcools, les cétones, le glycérol, l'acétate d'éthyle Il est insoluble dans les solvants apolaires tels que le benzène, l'huile de paraffine, l'éther éthylique, le chloroforme etc..

Son spectre d'absorption dans les solvants organiques est sensiblement identique à celui qu'on observe pour le BET fixé sur les acides nucléiques avec le même maximum d'absorption à 520mμ.

La fluorescence des solutions organiques est considérablement augmentée. C'est ainsi que dissous dans l'acétone et le

glycérol pour une longueur d'onde d'excitation de 546 mμ l'intensité de fluorescence émise à 590 mμ est respectivement 32 fois et 13 fois plus élevée que dans l'eau. Le spectre d'excitation de fluorescence dans l'acétone est comparable à celui du BET fixé sur le DNA ou le RNA, les valeurs des deux maxima sont identiques. D'autre part, dissous dans une solution visqueuse d'acétate de cellulose dans l'acétone, la fluorescence du BET est la même qu'en solution dans l'acétone pure. De même si le BET est dissous dans une solution aqueuse très concentrée de saccharose ou une solution aqueuse très concentrée en sel, l'intensité de fluorescence émise par le colorant libre augmente, tandis que l'intensité de fluorescence émise par le colorant fixé demeure inchangée. En solution concentrée en urée, la fluorescence du BET pur augmente, pour une longueur d'onde de 546 mμ la fluorescence émise à 590 mμ est environ deux fois plus élevée en urée 7 M.

– *Fixation du BET sur le polyvinylsulfate (P.V.S.)*

A force ionique faible à pH 7,5 on observe que le spectre d'absorption du BET est modifié, il se fixe donc sur le PVS. Le spectre obtenu en présence d'un large excès de PVS est comparable à celui obtenu dans le cas du DNA. La position du point isobestique est exactement le même que pour le système DNA-BET.

Ceci suggère que le spectre du BET fixé sur le PVS est identique au spectre du BET fixé sur le DNA. Si l'on abandonne ces mélanges, au bout de 24 à 48 heures, la solution devient trouble et un léger précipité se forme.

En solution de force ionique élevée (HCl tris pH 7,5 0,1 M NaCl 1 M) aucune modification du spectre du BET et donc aucune fixation n'est observée.

*Résultats obtenus avec les dérivés voisins du BET* *

Nous avons étudié 7 composés voisins du BET qui du point de vue chimique sont classés en trois groupes.

1°) 5 dérivés différents par la nature du radical R fixé sur l'azote 10.

| | |
|---|---|
| $R_D$ 481 | R = méthyl |
| $R_D$ 1427 | R = propyl |
| $R_D$ 1446 | R = allyl |
| $R_D$ 1602 | R = pentyl |
| $R_D$ 1470 | R = hexyl |

* La formule de ces corps est donnée page. 4.

2°) 1 dérivé substitué sur l'azote 7 le prothidium qui possède 3 groupes $NH_2$ libre et 2 fonctions amonium quaternaire.

3°) 1 dérivé nitré sur le radical phényl en para le $R_D$ 1662.

Tous les dérivés de la première série forment des complexes avec les acides nucléiques et l'augmentation de la fluorescence qui accompagne cette complexation est du même ordre de grandeur que dans le cas du BET.

Le dérivé de la deuxième série forme un précipité insoluble avec le DNA.

Le composé de la troisième série forme un complexe avec le DNA, car son spectre d'absorption est déplacé de la même manière que dans le cas du BET, mais on ne note aucune augmentation de la fluorescence en présence du DNA. Pour ce dernier composé le maximum du spectre d'émission est modifié. Il est égal 440 mμ, d'autre part pour ce composé la fluorescence est également augmentée en solution acétonique.

## C) VARIATION DES CARACTERISTIQUES MOLECULAIRES DU DNA

*– Action sur la viscosité du DNA*

Lorsque l'on ajoute à une solution de DNA des quantités croissantes de BET, la viscosité de la solution augmente notablement comme on peut le remarquer sur le tableau IX. Si l'on détermine la viscosité intrinsèque apparente et la constante de HUGGINS, c'est à dire en supposant que la concentration en soluté est restée égale à celle du DNA, en présence d'un grand excès de BET et en milieu concentré en sel on trouve les résultats figurés sur le tableau X.

En fait, puisqu'il y a interaction DNA-BET la concentration du soluté responsable de l'augmentation de la viscosité n'est pas la concentration du DNA, mais la concentration du DNA augmentée de la concentration du BET fixé. Comme on se trouve en présence d'un grand excès de BET, on admet que le DNA est saturé et que le complexe DNA-BET est formé d'une molécule de BET pour 5 de nucléotides. Dans ces conditions, il est possible en utilisant cette nouvelle concentration de calculer la viscosité intrinsèque et la constante k pour le complexe DNA-BET qui sont respectivement :

$[\eta]_{\text{DNA-BET}} = 10.000$ uCGS $\qquad k = 0,32$

| $\eta sp$ | 2,1 | 3,3 | 4,1 | 5,1 | 5,4 | 5,8 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| c BET µg/ml | 0 | 24 | 40 | 64 | 80 | 120 |

TABLEAU IX

Variation de la viscosité d'une solution de DNA (225 µg/ml en tampon Tris HCl 0,06 M $MgCl_2$ 0,025 M) en fonction de la concentration en BET.

| | $[\eta]$ | k |
|---|---|---|
| DNA | 7.500 | 0,56 |
| DNA - BET | 11.000 | 0,57 |

TABLEAU X

Viscosité intrinsèque et constante de Huggins apparentes du DNA et du DNA en présence d'un excès de BET. Pour ces déterminations la concentration en BET était de 500 µg/ml et la concentration de DNA a varié de 10 µg/ml à 100 µg/ml. La composition saline des solutions était : ClNa 1 M Tris HCl 0,1 M pH 7,5.

*– Effet sur la constante de sédimentation du DNA*

La constante de sédimentation du DNA est comparée à la constante de sédimentation du DNA en présence du BET dans les mêmes conditions de température et de composition saline des solutions. Les résultats sont figurés sur le tableau XI.

| | DNA c = 10 µg/ml | DNA c = 10 µg/ml<br>BET c = 10 µg/ml | DNA c = 10 µg/ml<br>BET c = 20 µg/ml |
|---|---|---|---|
| s | 24 S | 21,4 S | 20,2 S |

TABLEAU XI

Effet du BET sur la constante de sédimentation du DNA
Les mesures sont faites à 20°C à une concentration en DNA c=10µg/ml telle que l'effet de la concentration sur la constante de sédimentation peut être négligé. La composition saline des solutions est : NaCl 0,1 M, Tris HCl 0.1 M pH 7.5.

*– Effet sur la température de fusion du DNA ($T_m$)*

Lorsque l'on ajoute du BET à une solution de DNA la température de fusion $T_m$ du DNA augmente considérablement, comme on peut le remarquer sur la figure 18. Cette stabilisation est d'autant plus marquée que la force ionique est plus basse, tableau XII

La largeur de la transition n'est pas affectée comme on peut le voir sur la figure 18, où l'on remarque qu'en coordonnées Gauss-arithmétique on obtient deux droites parallèles.

*– Action sur la densité apparente du DNA en gradient de chlorure de Césium.*

On constate, comme on peut le remarquer sur le tableau, qu'en présence de BET le DNA est considérablement allégé, alors que la largeur de la bande n'est pas modifiée

| | densité |
|---|---|
| DNA témoin<br>2 µg/ml | 1,701 |
| DNA 2 µg/ml<br>+ BET 10 µg/ml | 1,641 |
| DNA 2 µg/ml<br>+ BET 15 µg/ml | 1,613 |

TABLEAU XIII

Effet du BET sur la densité apparente du DNA de souris en gradient de densité de chlorure de Césium à 25°C.

| | $\Delta T_M$ | |
|---|---|---|
| c BET<br>µg/ml | 1 | 2 |
| | (Tm = 85,5) | (Tm = 77) |
| 0 | 0 | 0 |
| 2,5 | 1 | 3,5 |
| 5 | 1,5 | 6,5 |
| 10 | 3,5 | 8,5 |
| 15 | 4 | 10,5 |
| 20 | 4,5 | 11 |

TABLEAU XII

Effet de la concentration en BET sur le $T_M$ du DNA à deux forces ioniques. La concentration en DNA est dans les deux cas 20 µg/ml. La composition saline des solutions est :

1° - ClNa 0,04 M Tris HCl 0,1 M pH 7,5
2° - ClNa 0,004 M Tris HCl 0,025 M pH 7,5

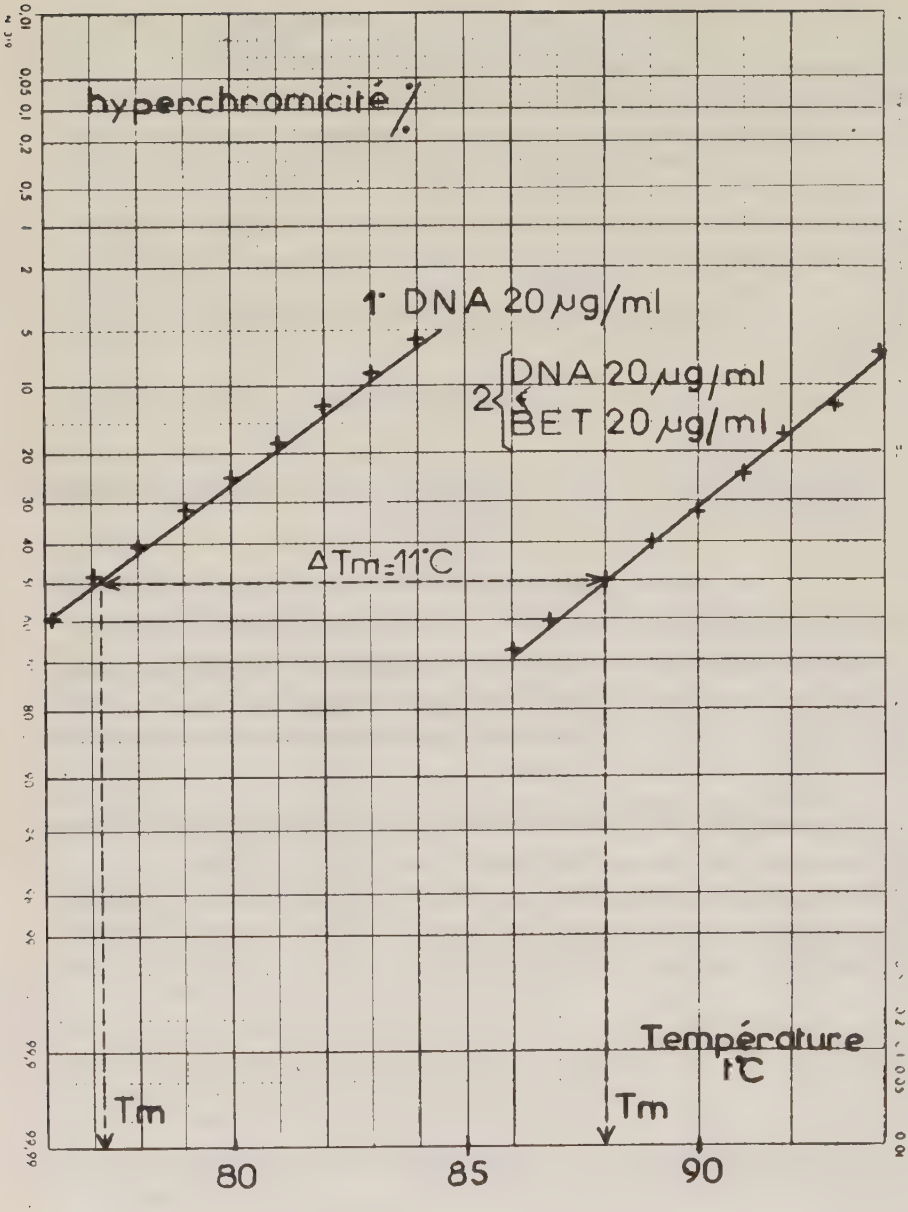



FIGURE 18

Représentation en coordonnées Gauss-Arithmétique de la fusion du DNA comparée à celle du DNA en présence de BET.
La composition saline des solutions est ClNa 0,004 M, Tris HCl 0,025 M pH 7,5.

## DISCUSSION

Un des faits les plus remarquables dans l'interaction du BET avec les acides nucléiques est sa plus grande affinité pour les acides nucléiques natifs dont la structure est à deux brins.

Ceci est clairement montré par les faits expérimentaux suivants :

L'augmentation de fluorescence du BET provoquée par les acides nucléiques devient pratiquement nulle lorsque l'on se trouve à des pH où les acides nucléiques sont complètement dénaturés et donc sous forme à un seul brin. L'augmentation de fluorescence du BET en présence des polyribonucléotides à un brin est presque négligeable comparativement à celle observée pour les structures à deux brins.

Dans le cas des AN dénaturés par la chaleur, les différences observées sont moins importantes. Ceci est du au fait que les AN peuvent se renaturer partiellement au cours du refroidissement comme cela est montré par leurs propriétés optiques (25 ) et leur courbe de titration (25). Il n'est pas alors surprenant que dans le cas du DNA chauffé les résultats obtenus soient comparables à ceux obtenus avec le DNA de Ø × 174 qui est un DNA à un seul brin (65) mais qui forme en se repliant sur lui même des zones hélicoïdales de type deux brins (65) (72).

Pour les AN formolés chauffés, les résultats obtenus montrent que ces formes fixent moins le BET tout en augmentant de la même façon sa fluorescence. Toutefois ces AN ne peuvent pas être considérés à proprement parlé comme des AN à un brin car l'action du formol les a profondément modifiés et leurs réactions sont, dans de nombreux domaines, fort différentes par exemple en ce qui concerne leur antigénicité (67) et leur pouvoir inhibiteur vis à vis de la DNAse II. Dans ce cas, le RNA formolé chauffé se révèle beaucoup plus inhibiteur que le RNA natif (23) et a donc plus d'affinité pour le DNase II. La réaction du formol augmente certainement l'acidité apparente du groupe phosphate comme elle augmente l'acidité des amino-acides. (Cette dernière propriété est utilisée pour la "formol titration" des acides animés). Les interactions ioniques d'un corps chargé positivement comme le BET avec un polynucléotide formolé sont donc certainement plus importantes que pour un polynucléotide non traité.

L'augmentation de la température de fusion du DNA est également un argument supplémentaire montrant la plus grande affinité du BET pour la structure native du DNA. (47(

En effet la dénaturation du DNA peut être schématisée :

$$\text{hélice} \rightleftharpoons \text{pelote}$$

Cette transformation se faisant avec une variation d'énergie libre :

$$\Delta G^{\circ}_{1},\ A\ T_m \qquad \Delta G^{\circ}_{1} = 0$$

Dans le cas d'un complexe DNA-BET la transition peut être schématisée :

$$\text{Hélice-BET} \rightleftharpoons \text{BET-pelote} \qquad \Delta G^{\circ}_{2}$$

hélice-BET est l'état initial, pelote-BET l'état final, $\Delta G^{\circ}_{2}$ est indépendant du chemin suivi pour arriver à l'état final. On aura donc, si les variations d'énergie libre pour les réactions suivantes sont :

$$\text{hélice-BET} \rightleftharpoons \text{hélice} + \text{BET} \qquad \Delta G^{\circ}_{3}$$

$$\text{pelote-BET} \rightleftharpoons \text{pelote} + \text{BET} \qquad \Delta G^{\circ}_{4}$$

et en admettant que le nombre de sites sur l'hélice et la pelote n'a pas changé de façon significative :

$$\Delta G^{\circ}_{2} = \Delta G^{\circ}_{3} + \Delta G^{\circ}_{1} - \Delta G^{\circ}_{4} \qquad (14)$$

Si $\Delta G^{\circ}_{3} = \Delta G^{\circ}_{4}$, c'est à dire si l'affinité du BET pour le DNA sous forme native et dénaturée est la même, il n'y a pas de stabilisation thermique :

$$\Delta G^{\circ}_{1} = \Delta G^{\circ}_{2}$$

le $T_m$ ne peut varier $\Delta G^{\circ}_{2} = \Delta G^{\circ}_{1}$

Par contre, si $+\Delta G^{\circ}_{3} > +\Delta G^{\circ}_{4}$, c'est à dire si l'affinité du BET pour la structure native est plus grande que pour la structure dénaturée, on doit observer une stabilisation thermique du DNA avec augmentation du $T_m$

Dans le cas contraire, on devrait observer une déstabilisation.

Dans ces conditions, on peut admettre que le nombre de sites de fixation du BET sur les polynucléotides n'est que le reflet de la proportion d'hélice à deux brins dans la chaine du polynucléotide. Ce nombre est effectivement deux fois plus faible pour le RNA que pour le DNA, où il a été démontré qu'il y avait dans le RNA un nucléotide sur deux environ d'apparié (10). D'autre part, les expériences sur les hybrides entre polynucléotides synthétiques montrent que l'augmentation de fluorescence est proportionnelle à la quantité d'hybrides formés.

Il découle de ces résultats que les mesures de la variation de l'intensité de fluorescence du BET lorsqu'il se fixe sur les polyribonucléotides permettra très facilement de reconnaître des structures à 1, 2 et même 3 brins comme il sera montré dans la suite de ce travail.

Un autre fait remarquable concernant l'importance de la structure des AN est qu'une dégradation ménagée sans dénaturation ne provoque pas de variation de l'affinité du BET pour le DNA Cette propriété est très utile car elle permettra d'établir aussi, comme il sera montré dans ce travail, une méthode de dosage spectrofluorimétrique des AN natifs qui sera indépendante des variations modérées du poids moléculaire des préparations de DNA Dans cette optique, le fait que la composition en base du DNA n'ait pas d'influence sur la fixation du BET est également intéressant. Ce dernier résultat est démontré par l'égalité de réactivité du DNA de composition en base aussi différent que celui de thymus de veau (42 % de GC) de Micrococcus Lysodeikticus (72 % GC) et de Proteus vulgaris (37 % de GC) (62)

Ceci est en accord avec le fait que la largeur de la transition de dénaturation thermique n'est pas modifiée en présence de BET. S'il y avait eu une stabilitation préférentielle de la paire A-T ou de la paire GC on aurait du observer une variation de la largeur de la transition. De même la largeur de la bande en équilibre de densité est inchangée Il n'y a donc pas eu d'augmentation d'hétérogénéité de densité qui aurait été provoquée par une fixation préférentielle

En conséquence le fait que la fixation du BET par le poly AT est différente devrait plutôt être attribué à sa structure secondaire différente qu'à sa composition en base particulière Il a été en effet démontré que le poly AT synthétique était, comme le DNA synthétique, branché (22).

Le fait que le degré de polymérisation et la composition en base n'influent pas sur la fixation du BET explique vraisemblablement pourquoi le BET se fixe de la même façon sur les trois fractions de RNA 4 S, 16 S et 27 S extraites du foie de rat.

Le type de liaisons intervenant dans la fixation du BET ne peut être déterminé clairement Si à faible force ionique les liaisons de type ionique résultant de l'interaction de charges de signe contraire peuvent jouer un rôle, par contre à force ionique élevée, la contribution de ce type de liaisons à la stabilité du complexe est négligeable.

Pour expliquer la fixation du BET sur les AN à force ionique élevée, et étant donné la valeur des énergies de fixation, seules des liaisons de type Van der Waals ou hydrogène pourraient être prises en considération.

Le fait que l'urée inhibe de façon compétitive la fixation du BET sur le DNA semblerait indiquer l'existence de liaisons hydrogène. Il a été affirmé (27), que l'action dénaturante de l'urée serait due à une compétition de l'urée pour les liaisons hydrogène, compétition qui est ici retrouvée. Toutefois d'autres auteurs, plus récemment (31) (32) (3) (60), ont montré que l'urée agissait vraisemblablement dans de nombreux cas par un autre mécanisme. Elle briserait le réseau d'eau liée autour des molécules en solution, "l'ice-like lattice" des auteurs anglo-saxons. Puisque l'urée aux concentrations employées n'a pas d'effet sensible sur le DNA, ce qui a été montré plusieurs fois (33) (45) et ce que nous avons vérifié, (on n'observe en effet aucune modification du spectre d'absorption du DNA) il y a tout lieu de penser que l'urée agit au niveau de l'eau liée au BET en solution. L'existence d'une telle interaction entre le BET et le solvant est d'ailleur susceptible de rendre compte d'un grand nombre de phénomènes, et en particulier de l'augmentation de fluorescence du BET lorsqu'il se fixe sur le DNA.

En plus de ce fait, cette interaction avec l'eau, du BET, est suggérée par les faits expérimentaux suivants :

- augmentation de la fluorescence du BET avec la température. On devrait observer au contraire une diminution de fluorescence, la probabilité de conversion interne dans la molécule, qui assure la désactivation, augmentant avec la température (54). Une telle variation inversée de la fluorescence avec la température déjà observée avec le rubrène a été interprêtée en terme d'interaction avec le solvant. Le complexe solvant-rubrène étant censé fondre lorsque la température s'élève (54).

- spectre d'absorption et de fluorescence du BET en solution organique.

En solution organique, le BET a un spectre d'absorption différent de celui du BET en solution aqueuse. Ceci suggère qu'il existe un complexe BET-eau ayant un spectre d'absorption différent et un rendement de fluorescence diminué, l'eau assurant la désactivation du BET.

Si l'on admet en solution aqueuse, l'existence d'un tel complexe BET-eau, tous les facteurs qui sont susceptibles de dé-

truire ce complexe doivent amener un changement de spectre d'absorption du BET et une augmentation d'intensité de fluorescence. C'est effectivement ce que l'on observe. Lorsqu'on élève la température de la solution de BET en solution aqueuse comme nous l'avons vu, non seulement la fluorescence augmente, mais le spectre d'absorption est déplacé vers les grandes longueurs d'onde. De même l'urée augmente la fluorescence du BET en solution aqueuse et déplace de la même façon son spectre d'absorption.

Si un tel complexe BET-eau existe, l'augmentation de la fluorescence accompagnant sa fixation sur les AN peut facilement être expliquée. En effet, lors de la fixation du BET sur les AN le complexe BET-eau serait dissocié selon le schéma :

$$BET\text{-}H_2O + AN \rightleftharpoons BET\text{-}AN + H_2O$$

On comprendrait alors pourquoi le BET fixé sur les AN, n'ayant plus d'interaction avec l'eau, ait alors une fluorescence très augmentée et un spectre d'absorption modifié de la même façon que lorsqu'il est dissous en phase organique. Ce schéma semble confirmé par les résultats thermodynamiques.

En effet, on observe qu'à très faible force ionique l'enthalpie de fixation est nulle et que l'entropie augmente considérablement (+29 u.e/mole de BET lié). Un tel résultat qui traduit une augmentation du désordre s'interprète très bien selon le schéma précédent. La dissociation du complexe BET-eau, en entraînant la libération de molécules d'eau, provoquerait une augmentation considérable de l'entropie. Un tel résultat est d'ailleurs tout à fait comparable à celui obtenu dans le cas de l'actinomycine où l'on a montré que, pour la fixation, la variation d'enthalpie était également nulle et que la variation d'entropie était $\Delta S^\circ = 31$ u.e/mole d'actinomycine lié (18). Cette augmentation d'entropie est provoquée dans ce cas par la dissociation du complexe actinomycine-eau.

On note que, comme dans le cas de l'actinomycine, l'affinité du BET pour le DNA est principalement lié au facteur d'entropie. On comprend alors quel pourrait être le mécanisme de l'action de l'urée. En dissociant le complexe BET-eau, elle diminuerait le facteur d'entropie et par suite l'affinité du BET pour le DNA.

A concentration saline élevée, on observe par contre que le changement d'entropie accompagnant la fixation du BET est négatif. Ce fait suggère très fortement qu'il y a compétition entre le BET et les ions minéraux, et donc que la fixation du BET s'accompagne d'une libération d'ions, lesquels ayant une plus grande

affinité pour le solvant, provoquent une variation d'entropie négative par suite de la plus grande organisationdes molécules d'eau autour d'eux qu'autour du BET.

Cette compétition avec les ions minéraux est d'autre part suggéré par les faits suivants :

- allégement en gradient de densité de chlorure de césium Le BET en remplaçant le césium fixé sur le DNA, entrainerait évidemment un allégement.

- nombre de sites total disponibles inchangé et constante apparente d'association diminuée lorsque la concentration saline augmente.

D'autre part, il est possible en admettant la compétition entre cations et BET pour leur fixation sur le DNA, de calculer quelle serait l'incidence de cette compétition sur la valeur des constantes intrinsèques apparentes d'association et les différentes valeurs thermodynamiques et ainsi de voir si cette hypothèse est compatible avec les résultats obtenus.

Dans le cas d'une compétition entre le BET et les ions minéraux l'équation 10 devient, si $k_A$ est la constante d'association cation-DNA et $c_B$ la concentration libre du cation en solution (68) :

$$\frac{r}{c} = \frac{k_A (n - r)}{1 + k_B c_B} \qquad (15)$$

On peut alors définir une constante d'association intrinsèque apparente k' qui sera la constante effectivement mesurée en présence de sel :

$$k' = \frac{k_A}{1 + k_B c_B} \qquad (16)$$

ou :

$$\frac{1}{k'} = \frac{1}{k_A} + \frac{k_B}{k_A} c_B \qquad (17)$$

Si l'on porte $1/k'$ en fonction de $c_B$ par extrapolation à concentration nulle $c_B = 0$ on obtient $1/k_A$. La pente de la droite représentant l'équation 17 est égale à $k_B/k_A$ et permet de calculer $k_B$ après avoir déterminé $k_A$.

D'autre part à concentration saline élevée, 1 est négligeable devant $k_B c_B$ et l'équation 16 peut s'écrire :

$$\text{Log } k' = \text{Log } k_A - \text{Log } k_B - \text{Log } c_B \quad (18)$$

Mesurant k', connaissant $k_A$ et $c_B$, on calcule aisément $k_B$. Lorsque l'on fait ce calcul avec les résultats du tableau II on trouve :

$$\frac{1}{k_A} = 1{,}5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$$

$k_B/k_A = 13 \cdot 10^{-6}$ dans le cas du sodium

d'où : $k_B = 85$

en appliquant les résultats obtenus avec le magnésium à l équation 18 on trouve

$$k_{B_{Mg}} = 1.10^3$$

Ces résultats peuvent être comparés avec ceux mesurés directement par ROSS et SCRUGGS (58) qui trouvent une constante d'association intrinsèque apparente pour le sodium fixé au DNA égale à 36 (cette mesure est obtenue par électrophorèse du DNA) La constante d'association apparente entre le magnésium et le DNA trouvé par WIBERG et NEUMAN (74) varie entre 100 et 300

Dans le cas d'une compétition avec les cations minéraux les valeurs thermodynamiques caractéristiques de l équilibre peuvent être également calculées

En combinant les équations 11, 12, 18, on peut écrire pour les concentrations salines élevées

$$\text{Log } k' = \frac{\Delta H_B^\circ - \Delta H_A^\circ}{RT} - \frac{(\Delta S_B^\circ - \Delta S_A^\circ)}{R} - \text{Log } c_B \quad (19)$$

ou $\Delta H_A^\circ$, $\Delta H_B^\circ$, $\Delta S_A^\circ$, $\Delta S_B^\circ$ sont respectivement les variations d'enthalpie et d'entropie accompagnant la fixation du BET et du cation considéré sur le DNA

Si $\Delta H'^\circ$ est la variation d'enthalpie apparente mesurée, on peut écrire

$$\Delta H'^\circ = - \frac{R}{1/T2 - 1/T1} (\text{Log } k'_{T2} - \text{Log } k'_{T1}) \quad (20)$$

ou $k'_{T2}$ et $k'_{T1}$ sont les constantes intrinsèques d association apparentes à $T_2$ et $T_1$

En remplaçant Log $k'_{T2}$ et Log $k'_{T1}$ calculés à partir de l'équation 19, dans l'équation 20, on trouve, en supposant que $\Delta H^\circ_A$, $\Delta H^\circ_B$, $\Delta S^\circ_A$, $\Delta S^\circ_B$ et $c_B$ ne varient pas avec la température :

$$\Delta H'^\circ = \Delta H^\circ_A - \Delta H^\circ_B \qquad (21)$$

A concentration saline très faible, l'équation 16 peut s'écrire :

$$k' = \frac{k_A}{e^{k_B c_B}} \qquad (22)$$

qui permet d'écrire :

$$\text{Log } k' = \text{Log } k_A - k_B c_B \quad (23)$$

De même en portant cette valeur dans l'équation 20 :

$$\Delta H'^\circ = \Delta H^\circ_A - c_B (k_{BT2} - k_{BT1}) \quad (24)$$

Les équation 21 et 24 montrent clairement que, pour que $\Delta H'^\circ$ diminue avec $c_B$ comme cela est observé, il faut que $\Delta H^\circ_B$ soit positif ou ce qui revient au même que $k_B$ augmente avec la température.

Les valeurs de $\Delta H^\circ$ mesurées pour la fixation du magnésium sur un grand nombre d'esters organiques de l'acide phosphorique sont effectivement positives (6). On pourrait donc penser qu'il en est de même pour le DNA.

D'autre part l'équation 19 permet d'écrire pour les concentrations salines élevées :

$$\frac{\Delta S'^\circ}{R} = \frac{\Delta H'^\circ}{RT} - \frac{(\Delta H^\circ_A - \Delta H^\circ_B)}{RT} + \frac{(\Delta S^\circ_A - \Delta S^\circ_B)}{R} - \text{Log } c_B \qquad (25)$$

ou :

$$\Delta S'^\circ = \Delta S^\circ_A - \Delta S^\circ_B - R \text{ Log } c_B \qquad (26)$$

A faible concentration en sel $\Delta S'^\circ \simeq \Delta S^\circ_A$, $\Delta S^\circ_A$ est donc positif. comme $\Delta S_B$ est vraisemblablement également positif comme dans le cas de la fixation du magnésium sur le phosphate (6), on voit donc bien qu'à forte concentration en sel $\Delta S'^\circ$ diminuera et pourra même changer de signe lorsque $\Delta S^\circ_B$ et $c_B$ sont élevés, comme c'est effectivement le cas.

On constate donc que l'hypothèse de la compétition entre les cations et le BET avec le DNA conduit tant pour les constantes

d'association de ces cations que pour les grandeurs thermodynamiques caractéristiques de cet équilibre à des valeurs qui, non seulement qualitativement mais aussi, en première approximation, quantitativement, sont tout à fait en accord avec celles effectivement mesurées.

On peut donc admettre cette compétition en première approximation.

Dans ces conditions, la fixation du BET sur le DNA pourraient être schématisée :

- à concentration saline faible :

$$BET\text{-}H_2O + DNA \rightleftharpoons DNA\text{-}BET + H_2O$$

- à concentration saline élevée :

(Me symbolisant le cation fixé sur le DNA)

$$BET\text{-}H_2O + DNA\text{-}Me \rightleftharpoons DNA\text{-}BET + H_2O + Me\text{-}H_2O$$

Ce schéma implique, pour qu'il y ait augmentation de fluorescence lors de la fixation sur le DNA, que les groupes du BET qui interviennent dans la fixation avec le DNA soient ceux qui fixent l'eau. S'il existait d'autres groupes sur la molécule capables d'interagir avec l'eau et qui ne réagiraient pas avec le DNA, il est probable qu'il n'y aurait pas d'augmentation de fluorescence lors de la fixation. C'est sans doute pour cette raison que le dérivé $R_D$ 1662 qui possède un groupe nitré se fixé sur le DNA sans augmentation de fluorescence.

De même si le BET dans certaines conditions se fixait par un autre mécanisme, dans lequel n'interviendraient pas ces groupements hydratés, il ne devrait y avoir aucune augmentation de fluorescence. C'est très vraisemblablement ce qui se produit lorsque le BET se fixe sur le P.V.S. où la liaison est de type électrostatique puisqu'en forte concentration en sel il n'y a plus de fixation.

D'autre part, il est vraisemblable que ce sont les deux groupements aminés qui sont responsables de la fixation du BET sur les AN et que ces deux groupements sont liés sur les DNA natifs sur deux chaines différentes puisque les polymères à un seul brin ont une affinité plus faible. Dans ce cas, pour les polynucléotides à un brin il y aurait possibilité de pont inter-

moléculaire par l'intermédiaire du BET. Ceci explique vraisemblablement qu'à forte concentration en BET on observe un complexe insoluble BET-PVS et BET-AN dénaturé.

Etant donnée la distance entre les deux groupements amine qui est d'environ 10 A° et la longueur des liaisons hydrogènes, les deux hypothèses les plus vraisemblables en ce qui concerne la fixation du BET sur les AN sont :

- les deux groupements amines se fixent entre deux chaines, soit verticalement dans le petit sillon (la distance entre deux hélices est ici de 13 A°), soir par intercalation horizontale comme les acridines (40).

Certains arguments expérimentaux pourraient être avancés pour confirmer l'hypothèse de l'intercalation :

1°) la similarité de structure entre le noyau phénanthridine et le noyau acridine qui sont des isomères, et l'égalité des distances entre les deux fonctions amines du BET et des diaminoacridines.

2°) l'inhibition compétitive de la fixation du BET par la quinacrine dont on a démontré l'intercalation (41).

3°) l'augmentation de la viscosité du DNA que LERMAN considère comme une bonne indication d'intercalation (42). Toutefois ce critère ne semble pas démonstratif puisque l'actinomycine augmente la viscosité du DNA (42) et ne s'intercale pas (55) (18).

4°) L'augmentation du Tm
Les acridines qui s'intercalent augmentent le Tm du DNA (30) (42) et ce critère a donc été également avancé comme indiquant une intercalation (42) (30). Mais là aussi l'actinomycine qui augmente le Tm du DNA (55) ne s'intercale pas (18) (55).

Aucun de ces faits ne peut donc être considéré comme démonstratif d'une intercalation. Par contre d'autres faits montrent, au contraire qu'une intercalation est peu vraisemblable.

1°) L'augmentation de la fluorescence du BET.

La fluorescence des acridines est fortement diminuée lorsqu'elles se fixent sur le DNA (70). En effet une intercalation amène obligatoirement un échange entre les niveaux $\pi$ du noyau acridine, et de celui des bases (70) ce qui doit entrainer une désactivation de la molécule.

2°) La fixation des acridines est inhibée par les sels, mais l'urée est sans action (G. HARTMANN cité par REICH et GOLBERG (55) (13) (53), ce qui montre bien que la nature des liaisons est différente dans le cas du BET.

3°)) La diminution dans le cas des acridines (5) du nombre de sites de fixation avec la température.

Bien que l'inhibition de la fixation du BET par l'actinomycine soit non compétitive, ce qui démontre que les sites de fixation sont différents, il existe plus d'analogies entre la fixation du BET et de l'actinomycine. Celles-ci résident dans les faits suivants :

- augmentation de la viscosité du DNA,
- augmentation du Tm
- sensibilité à l'urée, insensibilité aux fortes concentrations de sel. (55)

En l'absence de faits plus précis qui ne peuvent être apportés que par des résultats de diffraction de rayons X et de dichroisme d'absorption ou de fluorescence sur des molécules orientées sur des films ou orientées par écoulement de solution, il n'est pas possible de préciser exactement la nature du site de fixation du BET. Toutefois, il n'est pas déraisonnable de supposer que le BET pourrait se fixer dans le petit sillon de l'hélice du DNA. C'est vraisemblablement de cette façon que se fixe l'actinomycine (55). Et il a été avancé que c'était par suite de cette position particulière que l'actinomycine était capable d'inhiber la RNA-polymérase (55). D'autre part, il a été démontré que le BET était un inhibiteur puissant de la DNA-polymérass et de la RNA-DNA dépendante-polymérase (16) (73).

# CHAPITRE III

## INTERACTION DU BET AVEC LES POLYRIBONUCLEOTIDES

Il a été montré que l'affinité du BET pour les acides nucléiques variait notablement avec leur structure secondaire. Ceci se traduit par des variations considérables de fluorescence lorsque le BET est ajouté à des polynucléotides dont la structure est à un brin ou à deux brins. Dans la première partie de ce chapitre seront exposés les résultats d'une étude où cette propriété sera utilisée pour caractériser les réactions d'hybridation entre polyribonucléotides, tandis que dans une deuxième partie cette propriété sera utilisée pour étudier et mettre en évidence les réactions d'échange entre polyribonucléotides.

### A - ETDUDE DES REACTIONS D'HYBRIDATION ENTRE POLYRIBONUCLEOTIDES

Les réactions d'hybridation entre polyribonucléotides sont habituellement étudiées par la méthode des variations continues (66). C'est celle que nous avons également utilisée, et en mêmes temps que la réaction d'hydridation est suivie en mesurant la modification du coefficient d'absorption à une longueur d'onde spécifique, la fluorescence des solutions après addition de BET est mesurée.

La figure 19 montre les résultats obtenus dans le cas de la réaction du poly A avec poly U. On voit que l'augmentation de l'intensité de fluorescence du BET est proportionnelle à la quantité d'hybrides formés et qu'il est facilement mis en évidence de cette manière la formation de deux types de complexes poly (A-U) et poly (A-2U). Lorsque cette expérience est faite avec le poly I et le poly C, on met de la même façon en évidence avec une augmentation de fluorescence tout à fait comparable la formation du complexe à deux brins poly (I-C).

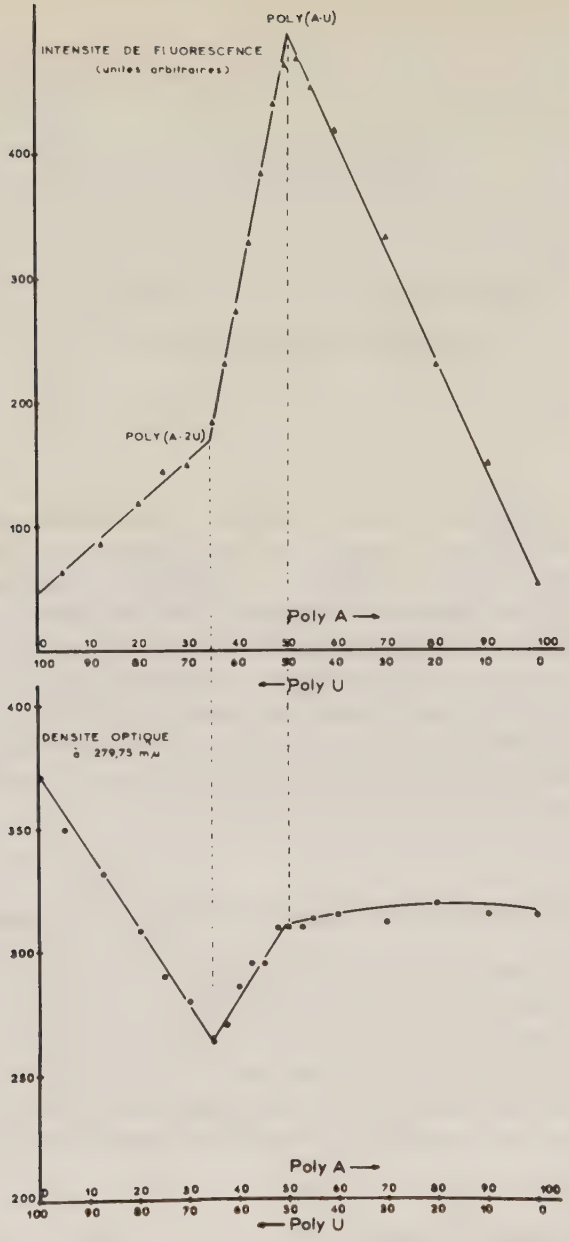



FIGURE 19

Etude de l'interaction poly A - poly U par la méthode des variations continues.

La formation des complexes est suivie par la mesure de la densité optique a 279,75 mμ (figure inférieure) et par mesure de l'intensité de la fluorescence des solutions obtenues à partir de celles ayant servies précédemment aux mesures de densité optique par dilution à moitié avec une solution de BET à 40 μg/ml.

Toutes les solutions sont : 0,2 M NaCl Tris HCl 0,2 M pH 7,4.

La concentration totale en nucléotide pour les mesures de densité optique est environ $10^{-4}$ M.

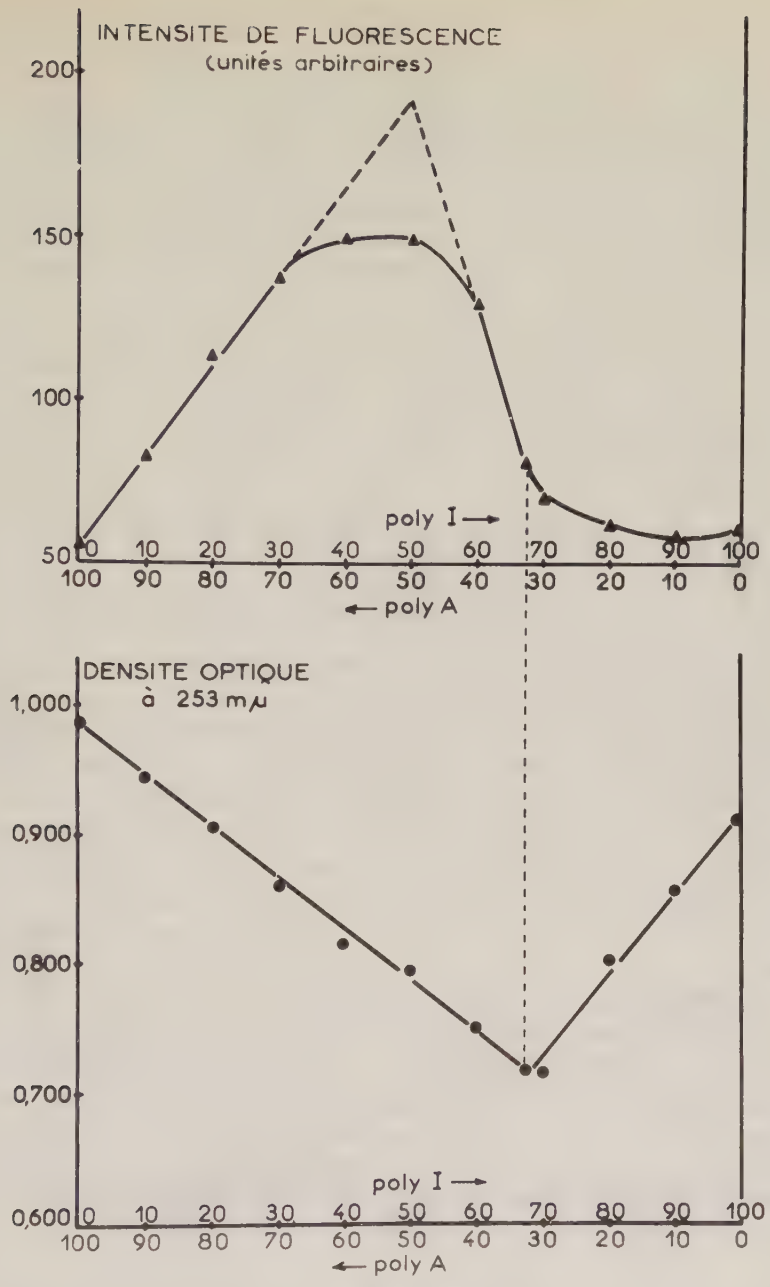



FIGURE 20

Etude de l'interaction poly A, poly I par la méthode des variations continues.

La formation des complexes est suivie par mesure de la densité optique à 253 mμ (concentration totale en nucléotides: environ $10^{-4}$M.) (figure inférieure) et par mesure de l'intensité de fluorescence des solutions obtenues à partir de celles ayant servies précédemment aux mesures de densité optique, en ajoutant à 1ml 0,1ml de BET à 40 μg/ml (figure supérieure).

Toutes les solutions sont en 0,1M NaCl, tampon phosphate 0,02M, pH6,9. Les mesures sont faites à la température du laboratoire

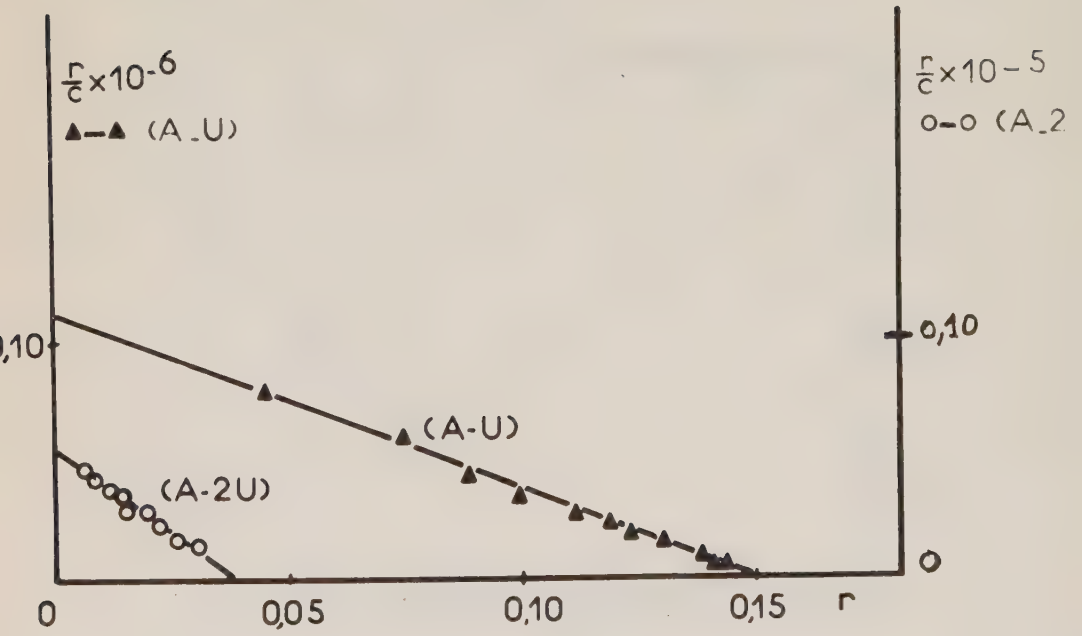



FIGURE 21

Etude de la fixation du BET sur le poly (A-U) et le poly (A-2U) représentée selon la méthode de SCATCHARD.
Les mesures sont faites en NaCl 0,2 M, tampon Tris HCl 0,2 M, pH 7,4 à 23°C.
Les constantes de dissociation pour le poly (AU) et le poly (A2U) sont respectivement :

$K_D$ (AU) = 1,4 $10^{-6}$ M  $K_D$ (A2U) = 8 $10^{-6}$ M

Il est intéressant de remarquer sur la figure 20 que les résultats obtenus par cette méthode suggèrent fortement l'existence d'un complexe poly (A-I), complexe qui ne peut être mis en évidence par la première méthode parce qu'il a été montré que le spectre d'absorption du poly (A-I) est identique au spectre du mélange poly (A2I) + poly A pour une même concentration en nucléotides (63).

La fixation du BET sur les polyribonucléotides peut être étudiée par fluorimétrie de la meme façon que pour les AN. Le facteur V est égal dans les mêmes conditions à celui trouvé pour le RNA, pour le poly (A-U), le poly (A2U) et le poly (I-C). La figure 21 montre les résultats de l'étude de la fixation du BET sur le poly (A-U) et le poly (A-2U) selon la représentation de SCATCHARD. Le résultat obtenu pour le poly (I-C) est similaire à celui obtenu pour le poly (A-U). L'augmentation d'intensité de fluorescence plus faible observée avec le poly (A2U) s'explique à la fois par une diminution du nombre de sites disponibles et une diminution de la constante intrinsèque d'association. On remarque que le nombre disponible de sites sur les hybrides à deux brins est plus élevé que pour le RNA, les proportions de nucléotides appariés étant plus élevées, mais qu'il reste inférieure à celui trouvé pour le DNA. Cette différence pourrait être due aux irrégularités d'appariement entre les polynucléotides et aux boucles qui peuvent se former. L'étude de la fixation du BET pourrait fournir donc un précieux outil pour l'étude de la structure des hybrides en fonction des conditions de leur formation.

En outre, étant donnée la grande sensibilité des mesures fluorimétriques, cette méthode peut permettre de détecter de très faibles quantités d'hybrides, de les doser, d'apprécier peut être la régularité de structure, d'étudier la cinétique des réactions d'hybridation et d'être un outil très utile pour toute étude concernant les polyribonucléotides. Un exemple en sera donné maintenant par l'étude des réactions d'échanges entre polyribonucléotides.

## B - ETUDE DES REACTIONS DE DEPLACEMENT ENTRE POLYRIBONUCLEOTIDES A L'AIDE DU BROMHYDRATE D'ETHIDIUM (BET). MISE EN EVIDENCE DU DEPLACEMENT DU POLY (A-2I) PAR LE POLY U.

La figure 22 montre les résultats obtenus dans le cas de la réaction entre le poly (A-2I) et le poly.C. Au point d'équivalence les concentrations de poly I et de poly C sont identiques environ $0,4 10^{-4}$M. La figure 23 montre les résultats obtenus pour la réaction entre le poly (A-2I) et le poly U. Il existe deux points

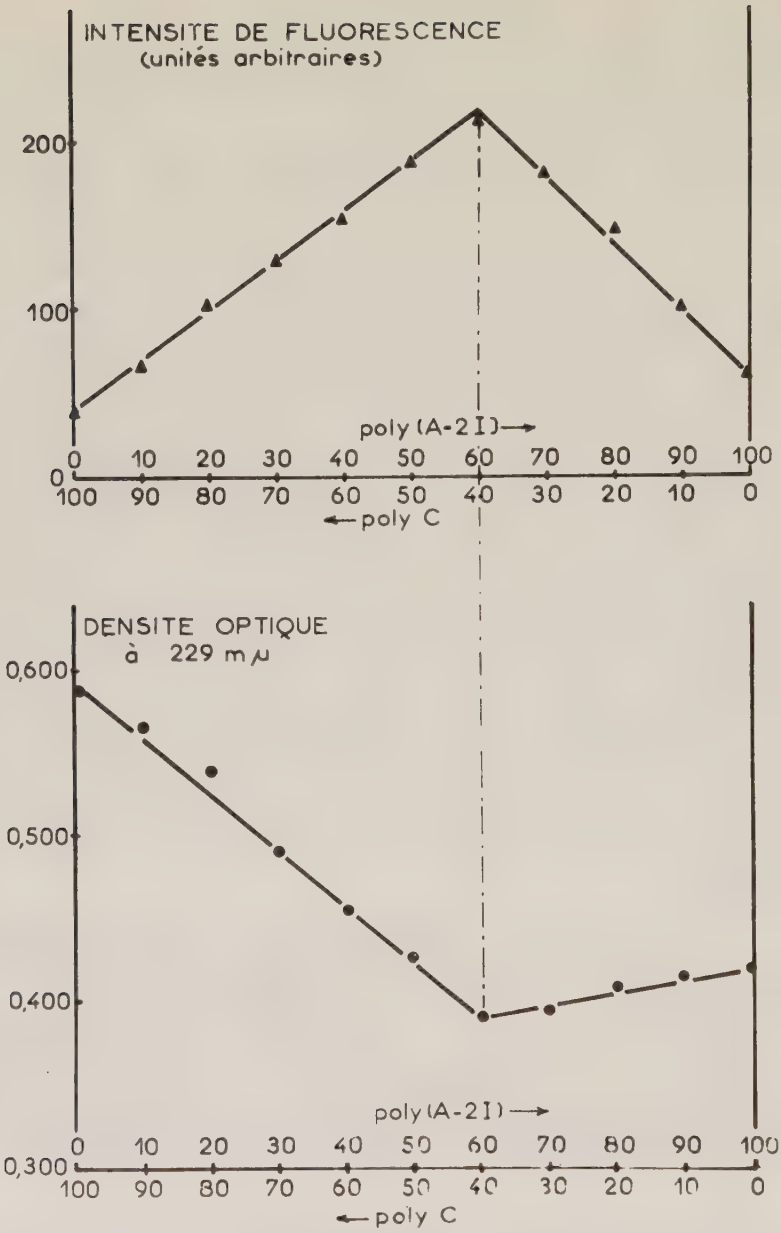



FIGURE 22

Réaction entre le poly (A-2I) et le poly C.
La concentration exprimée en nucléotide total est environ $10^{-4}$ M pour le poly (A-2I) et le poly C.
Les solutions sont en 0,1 M NaCl tampon phosphate 0,02 M, pH 6,9.
Les mesures sont faites à la température du laboratoire.

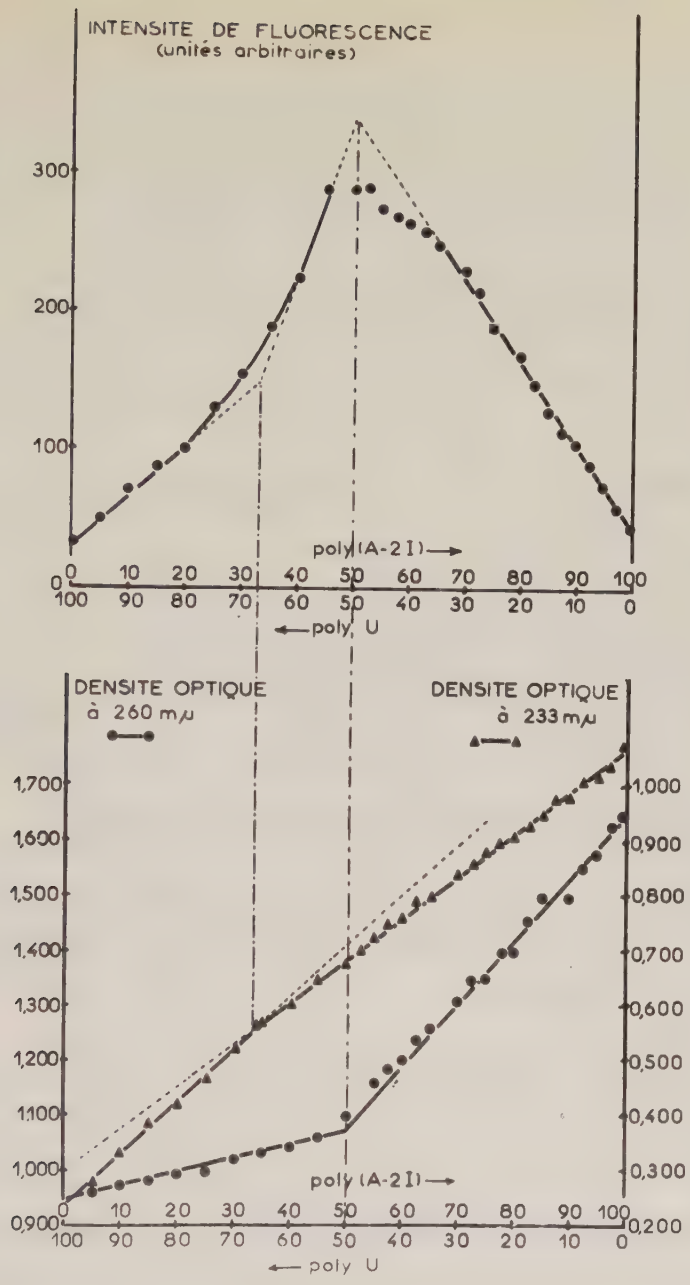



FIGURE 23

Mise en évidence d'une réaction de déplacement entre poly (A-2I) et poly U par la méthode des variations continues.
La concentration exprimée en nucléotide total est environ $10^{-4}$ M pour le poly U et $3.10^{-4}$ M pour le poly (A-2I).
Les mesures de densité optique sont effectuées 72 heures après le mélange des deux polyribonucléotides. Ces solutions sont ensuite diluées à moitié avec une solution de BET à 40 µg/ml pour la mesure de l'intensité de fluorescence. Toutes les solutions sont en 0,2 M NaCl, Tris HCl 0,2 M, pH 7,4. Les mesures sont faites à la température du laboratoire.

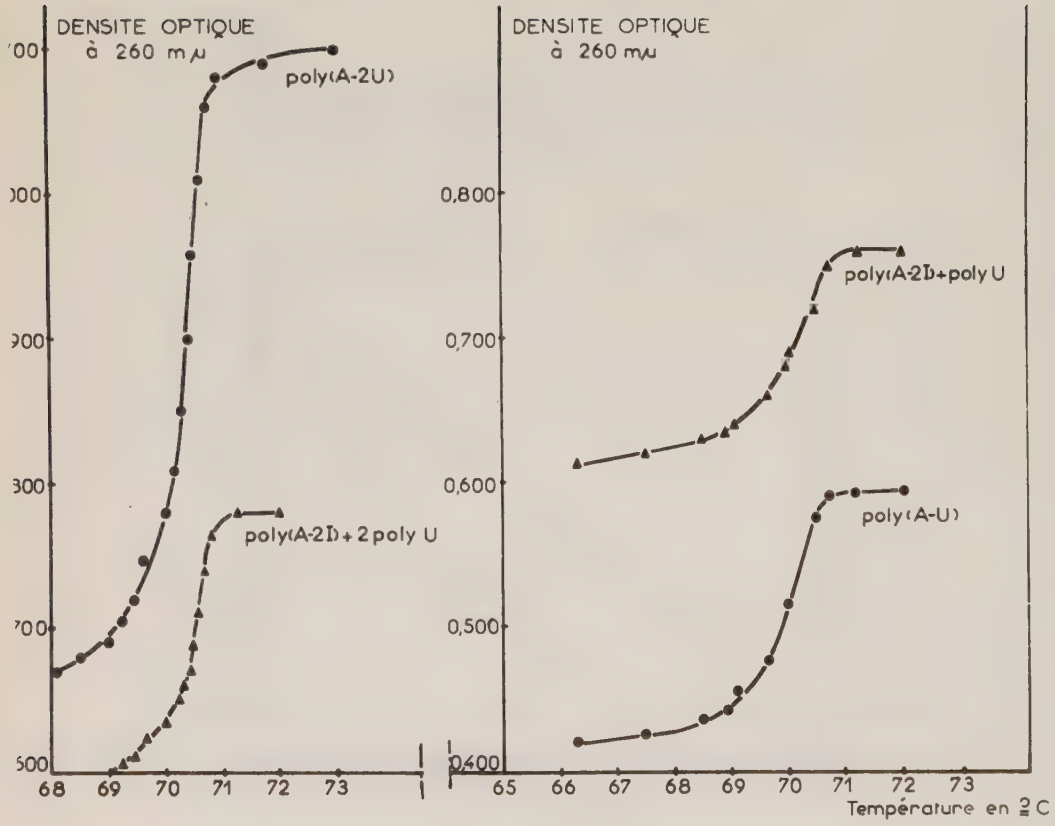



FIGURE 24

Courbes de dénaturation thermique comparée (a) - (à droite) produit de la réaction (poly (A-2I) + poly U) et poly (AU), la concentration de la somme des nucléotides A + U, est dans les deux cas identique ($0.5\ 10^{-4}$ M), (b) - (à gauche) produit de la réaction (poly (A-2I) + 2 poly U) avec poly (A-2U), la concentration de la somme des nucléotides A + U est deux fois plus grande pour poly (A-2U) que pour le produit de la réaction poly (A-2I) + 2 poly U) Toutes les solutions sont en 0,2 M Na Cl, 0,2 M tampon tris HCl, pH 7,4.

d'équivalence correspondant aux mélanges de composition (1A-1U) et (1A-2U). Les courbes de fusion des produits de la réaction poly (A-2I) + poly U et poly (A-2I) + 2 poly U sont comparées, sur la figure 24 aux courbes de fusions du poly (A-U) et poly (A-2U).

La fixation du BET sur le complexe à deux brins poly (I-C) est très différente de celle de ce même colorant sur le complexe à trois brins poly (A-2I) ; on peut donc suivre facilement la réaction de déplacement du poly (A-2I) par le poly C, réaction déjà mise en évidence par SIGLER et al (63).

Trois arguments permettent de démontrer la réaction de déplacement du poly (A-2I) par le poly U.

a) L'augmentation de fluorescence observée ne peut s'expliquer que par la production du poly (A-U) et poly (A-2U) seuls complexes actuellement connus capables, dans nos conditions expérimentales, de se former et d'augmenter la fluorescence du BET. D'ailleurs les diagrammes de fluorescence obtenus à partir des mélanges poly (A-2I) + poly U sont presque superposables aux diagrammes obtenus à partir des mélanges poly A + poly U (Fig. 19).

b) Existence de deux points d'équivalence pour des mélanges poly (A-2I) + poly U de composition (1A - 1U) et (1A-2U).

c) Identité entre les courbes de fusion du poly (A-2U) et du poly (A-U) et celles des produits de la réaction poly (A-2I) + poly U aux deux points d'équivalence.

Les légers écarts notés, à proximité de ces points d'équivalence, entre la fluorescence des produits des réactions poly U et poly (A-2I) + poly U avec le BET s'expliquent selon toute vraisemblance, par le fait que la réaction n'est pas totale ou que l'équilibre n'est pas encore atteint du fait de la lenteur de la réaction.

En conclusion, l'intérêt du BET pour la mise en évidence des réactions d'échange entre polyribonucléotides résulte :

a) de l'extrême sensibilité des mesures fluorimétriques: dans le cas présent, les mesures de densité optique seules ne permettent pas de suivre les réactions entre le poly (A-2I) et le poly U, dans les premières heures qui suivent le mélange de ces polymères.

b) de la spécificité de l'interaction de ce colorant vis-à-vis des polynucléotides de synthèse à structure secondaire organisée, notamment vis-à-vis des polyribonucléotides à deux brins.

# CHAPITRE IV

Dans ce chapitre sera exposé comment il est possible d'utiliser les propriétés de fixation du BET sur les acides nucléiques pour en effectuer d'une manière très simple le dosage par spectrofluorimétrie.

Les conditions du dosage découlent directement des caractéristiques de la réaction entre les AN et le BET qui vient d'être décrite. Aussi sera plus particulièrement traitée ici, l'interférence possible dans ce dosage des substances étrangères de nature biologique principalement.

Enfin, il sera montré également comment cette méthode permet d'effectuer le dosage des nucléases et d'étudier ainsi directement l'inhibition des DNases par le BET, inhibition qui, comme il le sera montré, résulte de la complexation du substrat.

## I - DOSAGE SPECTROFLUORIMETRIQUE DES ACIDES NUCLEIQUES AVEC L'AIDE DU BET

La façon dont il faut effectuer le dosage spectrofluorimétrique des AN à l'aide du BET, découle immédiatement des caractéristiques de l'équilibre AN-BET qui vient d'être exposé. En présence d'une quantité constante de BET, en excès par rapport aux AN, l'augmentation de la fluorescence du BET est une fonction linéaire de la concentration en AN (figure 25). Il suffit donc pour effectuer un dosage, d'établir deux courbes intensité de la fluorescence en fonction de la concentration en AN dans les mêmes conditions, l'une avec un AN dont on connait la concentration, et l'autre avec la préparation d'AN à doser.

Les conditions à respecter pour effectuer ce dosage dans les meilleures conditions sont :

- contrôle de la concentration saline des solutions.
  Un soin d'autant plus grand devra être pris pour s'assurer de l'identité de la composition saline du témoin étalon que l'on se trouve en plus faible concentration saline. A force ionique élevée, nous avons montré en effet que l'intensité de la fluorescence variait très peu avec la concentration saline. Pour éliminer les erreurs dues à des différences de concentration saline, il y aurait donc intérêt à se placer à des forces ioniques élevées, mais la sensibilité serait alors diminuée.

- pH des solutions
  n'importe quel pH dans le domaine de stabilité des AN peut être choisi.

- concentration en BET
  La concentration de BET doit être d'autant plus élevée que la concentration en AN est plus élevée puisqu'il doit être en excès. Il est facile de vérifier que le BET est en excès, en effet dans ce cas, l'intensité de la fluorescence varie de façon linéaire avec la concentration en AN. D'autre part, la concentration de BET à choisir pour effectuer ce dosage est également fonction de la sensibilité du fluorimètre qui servira à faire les mesures. Elle devra être comparativement plus faible avec un appareil très sensible. Nous donnons à titre indicatif (figure 25) les concentrations utilisées pour effectuer ce dosage en utilisant le spectrophotomètre Zeiss muni de son dispositif de fluorescence.

*- Sensibilité de la méthode*

Pour des solutions de composition définie, la sensibilité de la méthode est fonction de deux facteurs :

1°) Les conditions de lecture :

Nous avons vu que le facteur V était maximal pour des longueurs d'onde voisines de 545 et 360 mμ. Il y a donc intérêt dans la mesure du possible à choisir ces longueurs d'onde pour la lumière excitatrice. La longueur d'onde d'émission est évidemment choisie au maximum, c'est-à-dire à 590mμ.

2°) La sensibilité du spectrofluorimètre utilisé.

La pente de la droite représentant l'intensité de la fluorescence du mélange BET-AN en fonction de la concentration en AN est directement proportionnelle à la sensibilité de l'appareil de mesure. Les deux principaux facteurs intervenant sont :

a) l'intensité de la lumière excitatrice. L'intensité de la lumière émise étant proportionnelle à l'intensité de la

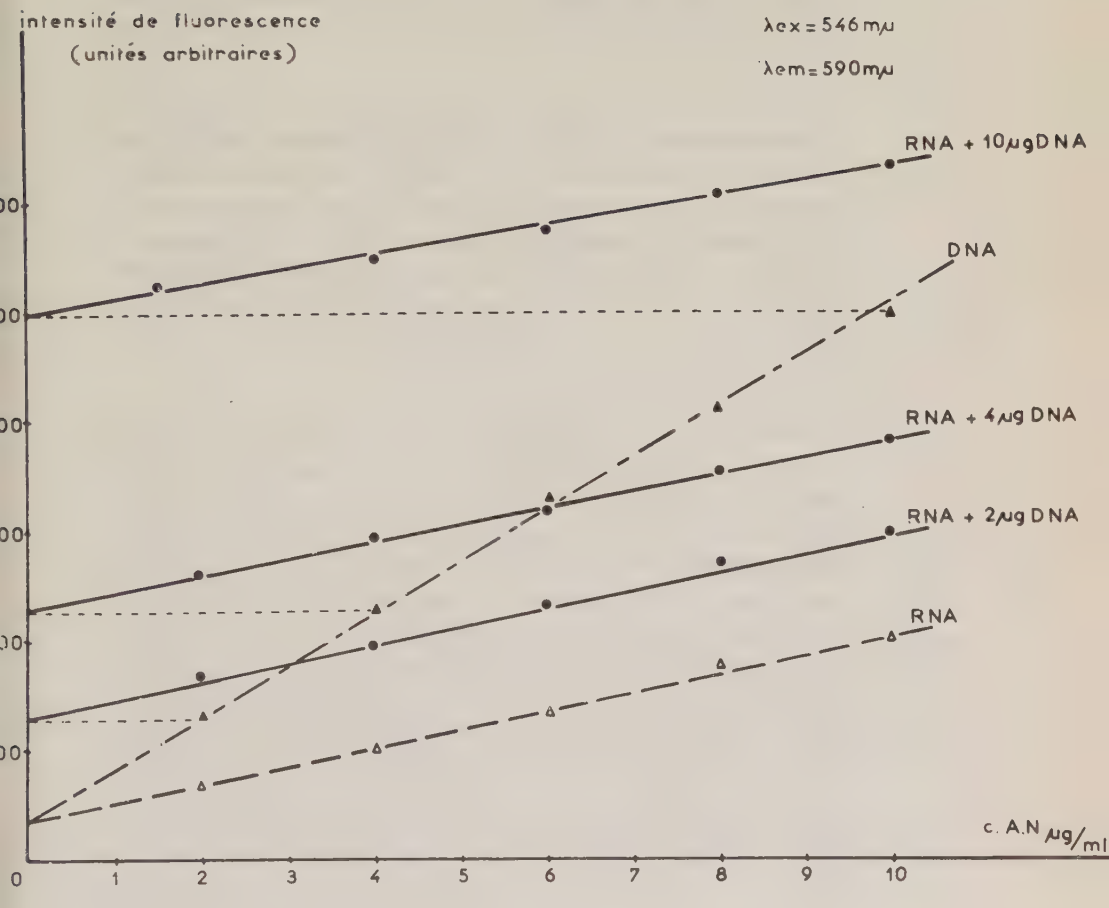



FIGURE 25

Dosage du RNA et du DNA dans un mélange :

Trois types de courbes sont tracées, correspondant à :

1°) DNA à concentration variable servant d'étalon DNA

2°) RNA à concentration variable servant d'étalon RNA

3°) RNA de concentration variable avec surcharge constante de DNA.

La concentration de BET est 7,5 μg/ml en milieu NaCl 0,1 M, Tris HCl 0,1 M, pH 7,5.

Après une première lecture, les solutions sont incubées en présence de 20 μg/ml de RNase pendant 24 heures à la température du laboratoire. Les résultats obtenus sont rapportés dans le texte.

lumière excitatrice, il y aura donc intérêt à choisir des lampes puissantes. Il est ici particulièrement heureux que les meilleures conditions d'excitation correspondent à des longueurs d'ondes où il est très facile d'obtenir des lumières monochromatiques de forte intensité à l'aide des lampes à vapeur de mercure dont les raies d'émission pour 365 mμ et 546 mμ sont très intenses.

Les dispositifs de fluorescence adaptables sur les spectrophotomètres (tel le dispositif Zeiss) qui généralement utilisent comme lumière excitatrice une lampe à vapeur de mercure avec un filtre adéquat pour séparer une raie de la lampe et comme dispositif de lecture le monochromateur et le phototube du spectrophotomètre, fournissent très souvent un appareillage sensible et simple de lecture.

b) la sensibilité du photo-tube.

La sensibilité est directement proportionnelle à la sensibilité du photo-tube. Il est ici dommage que les photomultiplicateurs les plus sensibles existants actuellement soient très peu sensibles dans la région de 590 mμ. On aura donc de ce fait souvent une mauvaise sensibilité. Toutefois, il est possible d'améliorer les conditions de lecture en amplifiant le courant à la sortie du phototube (un tel montage est effectué sur le spectrofluorimètre "Jobin Yvon" et assure une très bonne sensibilité). Dans ce cas, la stabilité nécessaire pour les lectures exige une stabilisation électronique absolument parfaite.

A titre indicatif, nous donnerons maintenant la sensibilité la meilleure que nous ayons obtenue avec le dispositif de fluorescence Zeiss. En milieu NaCl 0,1 M, tris HCl 0,1 M en présence de 3 μg/ml de BET avec une longueur d'onde d'excitation de 546 mμ, nous avons obtenu une relation parfaitement linéaire entre 0,01μg/ml et 0,1μg/ml de DNA. L'intensité du BET pur témoin était dans ces conditions de 60. Avec 0,01 μg/ml de DNA, elle était de 64. Dans ces conditions, 0,01μg/ml de DNA pouvait être apprécié, puisque cet appareil, dans ces conditions, est fidèle et reproductible à ± 0,2 division.

*Interférences*

L'augmentation de fluorescence du BET provoquée par un certain nombre de corps comparée à celle obtenue avec le DNA et le RNA est rapportée sur le tableau XIV.

| Produits | $I_1 - I_0$ | Produits | $I_1 - I_0$ |
|---|---|---|---|
| DNA natif | 100 | RNA natif (foie de rat) | 46 |
| DNA hydrolysé (DNase) | 2 | RNA natif (levure) | 46 |
| Héparine | 0,05 | RNA hydrolysé (RNase) | 0,7 |
| Plasma sanguin de lapin | 0,01 | Albumine de sérum bovin | 0,01 |
| Acide poly l glutamique | 0 | Chondroitine sulfate | 0,07 |
| d AMP d GMP | 0,03 | acide hyaluronique | 0,1 |
| d TMP d CMP | 0 | | |

TABLEAU XIV

Augmentation de fluorescence ($I_1 - I_0$) du BET en présence de différentes substances.

L'augmentation obtenue en présence de 10 µg/ml de DNA 7,5 µg/ml de BET en milieu NaCl 0,1 M, Tris HCl 0,1 M, pH 7,5 est prise arbitrairement égal à 100. L'augmentation obtenue pour les substances interférant peu, est mesurée sur des solutions concentrées (albumine et plasma sanguin 20 mg/ml de protéines, mononucléotides, héparine, ac. poly l glutamique, chondroitine sulfate 5 mg/ml, AN hydrolysés 100 µg/ml) Celle-ci est supposée être proportionnelle à la concentration de la substance essayée, et est rapportée à la concentration de 10 µg/ml.

Plusieurs faits peuvent être remarqués.

1°) Parmi les substances testées, aucune n'est capable, à proprement parler, d'interférer. L'augmentation observée en particulier avec les protéines est très faible. Il faudrait près de 10.000 fois plus de protéines pour observer la même augmentation de fluorescence. D'autre part cette augmentation de fluorescence très faible provoquée par les protéines n'est vraisemblablement pas spécifique. Elle pourrait être due à une compétition pour les molécules d'eau entre les protéines et le BET comme le font les sels à très haute concentration. Dans ces conditions, même dans un milieu très riche en protéines il sera toujours possible de doser les AN en effectuant des témoins ou des surcharges avec des quantités connues d'AN dans le milieu protéiques.

2°) L'augmentation de fluorescence obtenue avec les AN hydrolysés par les nucléases est négligeable devant celle obtenue avec les AN natifs. Cette propriété peut être mise à profit :

a) pour éliminer l'interférence éventuelle de substances parasistes.

En effet, il suffira de mesurer l'augmentation de fluorescence avant et après l'action de la nucléase spécifique, la différence entre ces deux mesures ne peut être alors due qu'à la présence d'AN natif.

b) doser dans un mélange le DNA et le RNA

On peut remarquer sur la figure 25 que l'augmentation de fluorescence obtenue dans un mélange DNA-RNA est bien la somme des augmentations de fluorescence qui seraient obtenues en présence de l'un des composants seul. D'autre part, après une première lecture qui a fourni les résultats représentés sur la figure 25, toutes les solutions ont été traitées par la RNase. Les résultats obtenues pour l'augmentation de la fluorescence dans les différents cas sont:

- étalon DNA : inchangé
- RNA étalon : pratiquement nul
- RNA variable + surcharge DNA constante :

Dans ce cas les valeurs obtenues correspondent sensiblement à la valeur de la surcharge en DNA.

Il découle donc de ces résultats que le dosage du DNA et du RNA même mélangés et en présence d'impuretés peut être effectué très facilement. Il suffira en effet d'ajouter une certaine quantité de BET à une solution dont la composition saline est connue, et de mesurer l'augmentation de la fluorescence du BET avant et après l'action de la ribonucléase, pour déterminer la concentration des deux AN dans le milieu.

D'autre part, la sensibilité de la méthode est celle de toutes les méthodes fluorimétriques, c'est à dire extrêmement appréciable. S'il existait deux méthodes (29) (57) de dosage fluorimétrique du DNA très sensibles, mais demandant souvent la réalisation de réactions chimiques longues et délicates, aucune méthode n'a été proposée dans le cas du RNA, où d'autre part les méthodes colorimétriques habituelles sont peu sensibles (9).

## II - APPLICATION AU DOSAGE DES NUCLEASES

### *A - Desoxyribonucléase*

- Principe :

Il est possible d'arrêter la réaction d'hydrolyse du DNA par les DNases, soit en ajoutant du citrate de sodium qui complexe les ions activateurs dans le cas de la DNase I, soit en augmentant la force ionique et le pH dans le cas de la DNase II. Il est donc possible de faire agir l'enzyme pendant des temps contrôlés et d'effectuer ainsi la cinétique de dégradation du DNA en mesurant pour différents temps sur ces solutions stabilisées, soit la chute du poids moléculaire soit le changement d'une propriété physique du DNA. En particulier, la dégradation du DNA peut être appréciée en mesurant la chute de l'affinité d'un colorant, le vert de méthyle, pour le DNA. Cette dernière méthode, adaptée par KURNICK (34) peut être ici directement utilisée en substituant au vert de méthyle le BET ; et au lieu de mesurer les variations du spectre du colorant, la variation de la fluorescence du BET est mesurée. Dans ces conditions, on constate qu'au début de la réaction l'intensité de la fluorescence du BET en présence d'une concentration constante de DNA décroit linéairement en fonction du temps de contact avec les DNases. La pente de cette droite est proportionnelle à la concentration d'enzyme.

On dispose donc ainsi d'un moyen de dosage très commode. Le procédé est tout à fait identique à celui de la méthode de KURNICK (34) mais ici trois avantages :

- L'équilibre DNA-BET étant immédiat il n'est pas nécessaire d'attendre 24 heures pour que l'équilibre soit réalisé comme dans le cas du vert de méthyle.

- L'environnement ionique peut être choisi librement par l'expérimentateur, quelle que soit la force ionique, le BET se fixe toujours sur le DNA, ce qui n'est pas le cas du vert de méthyle.

- La quantité de DNA utilisée peut être choisie très basse si on le désire et il est ainsi possible d'effectuer des cinétiques d'action de l'enzyme sur des quantités de DNA très faibles. Grâce à cette méthode la cinétique d'action de la DNase II, qui a une affinité très élevée, a pu être réalisée (24) en mesurant la vitesse de dégradation du DNA sur des solutions dont la concentration était inférieure à 5 µg/ml.

A titre indicatif, nous donnerons maintenant un mode opératoire type qui peut être réalisé pour effectuer le dosage des DNases I ou II dans des conditions de sensibilité appréciable. Il est évident que, à partir de ces schémas de nombreuses modifications peuvent être apportées selon le but recherché. En particulier la concentration en DNA, l'environnement salin, la concentration de BET peuvent être choisis dans un large domaine.

*- Mode opératoire pour le dosage de la DNase I*

Préparer le mélange :

| | |
|---|---|
| DNA dissout dans NaCl 0,1 M à 400 µg/ml | 2 ml |
| Tampon Tris HCl 0,4 M pH 7,5 | 2,5 ml |
| $SO_4$ Mg 0,3 M | 1,5 ml |
| Eau distillée | 9 ml |

porter à 37°C, laisser la température se stabiliser. Ajouter alors 1 ml de solution de DNase à doser. A des temps déterminés, prélever 3 ml du mélange réactionnel, et y ajouter 1 ml d'une solution de composition suivante : citrate de Na 0,33 M, BET 50 µg/ml.

Sur ces solutions, mesurer l'intensité de fluorescence et tracer la courbe intensité de fluorescence en fonction du temps d'action de la DNase. Déterminer la pente de cette droite qui est proportionnelle à l'activité DNasique. L'intensité de fluorescence étant proportionnelle à la concentration de DNA, la diminution de l'intensité de fluorescence peut être exprimée en diminution de concentration de DNA, et l'activité exprimée en chute de concentration de DNA par minute. On peut donc définir une unité comme la concentration de DNAse qui provoque dans les conditions déterminées, une chute de l'intensité de fluorescence par minute égale à celle qui serait provoquée si la concentration de la solution diminuait de 1 µg/ml et par minute. L'avantage de cette définition est qu'elle est indépendante de la concentration de BET choisie et des conditions de lecture de la fluorescence.

*– Mode opératoire pour le dosage de la DNase II*

Préparer la solution de composition suivante :

| | |
|---|---|
| DNA dissout dans NaCl 0,01 à 400 µg/ml | 2 ml |
| Tampon acétate pH 4,8 0,02 M | 12 ml |

Mettre au bain-marie à 37°C, laisser la température s'équilibrer, ajouter alors 2 ml de la solution de DNase à doser. A des temps déterminés prélever 3 ml de ce mélange auquel on ajoute 1 ml de la solution suivante :

| | |
|---|---|
| Solution citrate de sodium 0,33 M BET 50 µg/ml | 1 vol. |
| Tris HCl 0,1 M pH 7,5 | 3 vol. |

Lire l'intensité de la fluorescence et continuer comme pour le cas de la DNase I.

Dans le cas des RNases le même procédé peut être utilisé. Comme la réaction ne peut être arrêtée simplement, soit par augmentation de la force ionique ou par changement du pH, un inhibiteur spécifique des RNases doit être utilisé. Le PVS qui est un inhibiteur puissant des RNases peut être employé. Il n'interfera pas dans le dosage puisque il n'augmente pas la fluorescence du BET. Il suffira seulement d'ajouter un excès de BET de façon à pouvoir saturer tout le RNA.

## III – ETUDE DE L'INHIBITION DES DNases PAR LE BET

Nous avions montré (38) (39) que la quinacrine et le vert de méthyle étaient capables d'inhiber la désoxyribonucléase I, et nous avons démontré que cette inhibition s'interprétait par suite de la complexation du substrat. La cinétique était tout à fait en accord avec la théorie de REINER (56) concernant l'inhibition par complexation du substrat. Ceci a été vérifié ensuite pour d'autres colorants se fixant sur le DNA. (LEITH (37)).

L'étude cinétique, selon REINER (56) consiste à faire varier la concentration de l'inhibiteur, tout autre facteur demeurant constant, et à étudier la fonction $I_t = f\left(\frac{i}{1-i}\right)$ ou $I_t$ est la quantité d'inhibiteur total ajouté dans le milieu et

$$i = \frac{\text{Vitesse sans inhibiteur} - \text{Vitesse avec inhibiteur}}{\text{Vitesse sans inhibiteur}}$$

On montre que cette fonction a une tangente à l'origine de pente $y_1$ et qu'elle est asymptote à une droite de pente $y_2 < y_1$ qui coupe l'axe des ordonnées au point d'ordonnée $S_t$, nombre de molécules de substrat totales dans le milieu. Cette représentation est obtenue dans deux cas correspondant à :

1°) L'inhibition apparente de l'enzyme est due uniquement à une diminution de la concentration de substrat par suite de la complexation d'une partie du substrat.

2°) En plus de la diminution de la concentration de substrat, l'inhibition de l'enzyme est due à une fixation inhibitrice de l'enzyme sur le complexe substrat-inhibiteur, les deux cas peuvent être représentés par les équilibres :

a) $S + E \overset{K_1}{\rightleftharpoons} C$ $\qquad$ $C \xrightarrow{k_2} E + P$ $\qquad$ $S + I \overset{K_3}{\rightleftharpoons} SI$

b) $S + E \overset{K_1}{\rightleftharpoons} C$ $\qquad$ $C \overset{K_2}{\rightleftharpoons} E + P$ $\qquad$ $S + I \overset{K_3}{\rightleftharpoons} SI$ $\qquad$ $SI + E \overset{K_4}{\rightleftharpoons} SI\text{-}E$

ou S, E, I, C, P, SI, SIE représentent respectivement les concentrations en substrat libre, enzyme libre, inhibiteur libre, complexe enzyme substrat, produit de la réaction, complexe inhibiteur substrat, complexe inhibiteur substrat enzyme, $K_1$, $K_2$, $K_3$, $K_4$ sont les différentes constantes de dissociation associées à ces équilibres.

Dans le cas du BET, i peut être très facilement mesuré, il suffit en effet de faire le rapport vitesse sans inhibiteur/ vitesse avec inhibiteur. Ce rapport est facilement calculé en faisant le rapport des pentes des droites intensité de fluorescence en fonction du temps d'incubation de l'enzyme déterminées en ajoutant le BET pendant l'action de l'enzyme et après l'action de l'enzyme.

Les résultats obtenus sont portés sur la figure 26. Ils montrent que l'inhibition des DNA par le BET suit les lois de l'inhibition par compléxation du substrat. La valeur de $S_t$ trouvée est la même pour la DNase I et II. Elle est identique à celle trouvée pour les autres colorants (37)(38)(39).

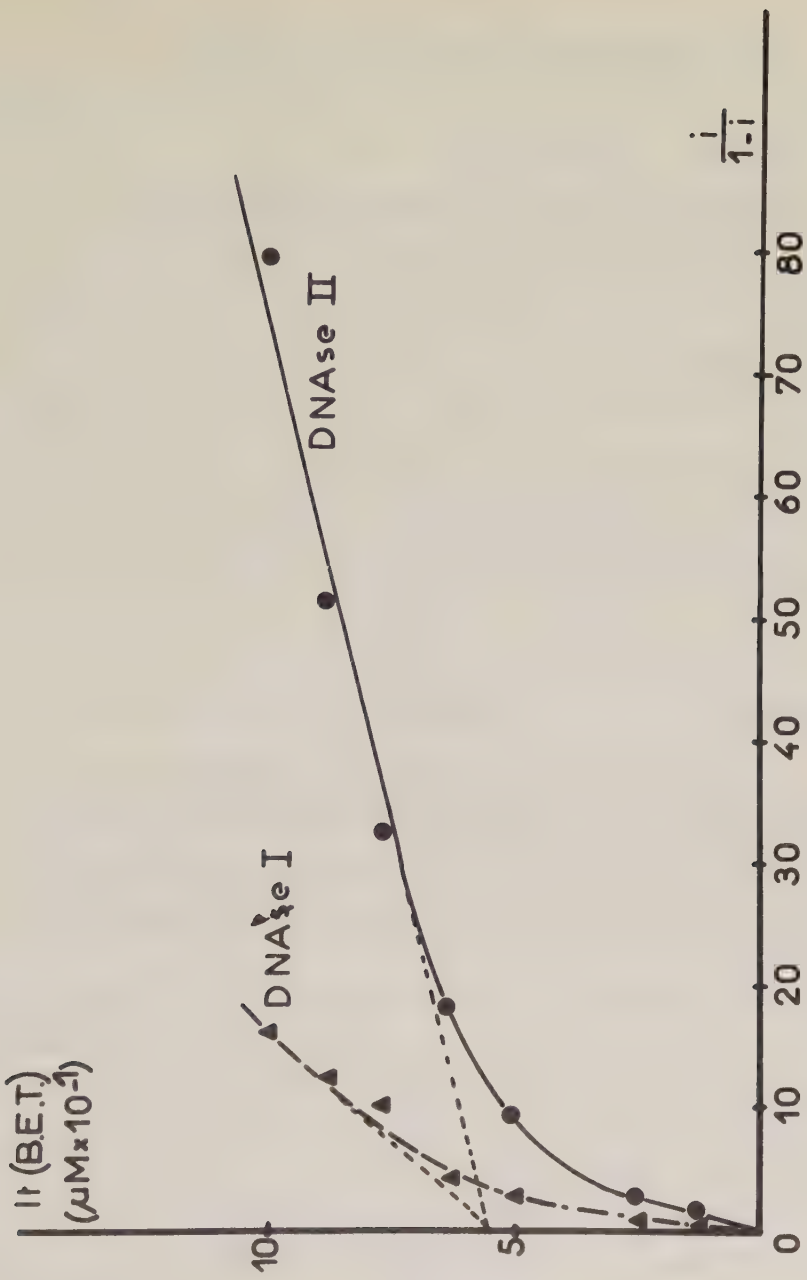



FIGURE 26

Inhibition des DNases par le BET.
Dans le cas de la DNase I, la composition du milieu d'incubation est : Tris HCl 0,06 M, pH 7,5, $Cl_2Mg$ 0,028 M, DNA 95 µg/ml
Dans le cas de la DNase II, la composition du milieu d'incubation est : DNA 98 µg/ml, tampon acétate 0,075 M, pH 4,8 EDTA 0,5 $10^{-2}$M.

D'autre part on a (38) :

$$\frac{y_2}{y_1} = \frac{S_t}{K_3} + 1$$

ce qui permet de déterminer les constantes de dissociation $K_3$.

Dans le premier cas (DNase I)

$$K_3 = 3,3\ 10^{-5}\ M$$

DNase II :

$$K_3 = 1,9\ 10^{-5}\ M$$

D'autre part $y_2 - K_3$ étant négatif, ceci montre (38). que c'est le deuxième cas, c'est à dire où le complexe SI est inhibiteur de l'enzyme qui rend compte des résultats ; et comme $y_2$ est plus petit dans le cas de la DNase II, $K_4$ est également plus petit dans ce cas.

**DISCUSSION :**

La valeur de $S_t$ correspond à un poids moléculaire du substrat apparent égal à celui de 6 nucléotides environ. Ce résultat peut s'expliquer de deux façons.

1°) Soit parce que, lorsqu'il y a une molécule de colorant fixé pour six nucléotides, la DNase ne peut plus se fixer sur le DNA, par empêchement stérique par exemple.

2°) Soit parce qu'il y a environ une liaison sur six qui est susceptible d'être attaquée par l'enzyme. Cette dernière possibilité a été discutée (38) et il a été montré que si la deuxième explication est la bonne, les valeurs de $S_t$ devraient varier avec la composition en base du DNA. Le BET est le colorant de choix pour réaliser cette expérience car sa fixation ne varie pas avec la composition en base du DNA.

D'autre part, les constantes de dissociation calculées ici, ne sont pas des constantes intrinsèques, mais des constantes rapportées à la molécule de substrat apparente qui est ici voisine de six nucléotides. Elles ne peuvent donc être comparées directement aux constantes intrinsèques mesurées. On peut seulement constater qu'elles sont du même ordre de grandeur, et que la constante mesurée en présence de magnésium (DNase I) est plus élevée, comme c'est normal, que la constante en l'absence de magnésium (DNase II).

Comme dans le cas de la quinacrine et du vert de méthyle, les résultats obtenus s'interprètent très bien selon la théorie de REINER sur l'inhibition par complexation du substrat.

# CONCLUSION - RESUME

Ce travail a été consacré à l'étude de l'interaction avec le DNA et le RNA d'une série de composés dérivés de la phénanthridine et principalement le bromhydrate d'éthidium (BET) employés en médecine vétérinaire comme trypanocide. Il a été montré que l'une des particularités les plus intéressantes de cette interaction était l'augmentation considérable de la fluorescence du bromhydrate d'éthidium (BET) lorsqu'il se fixait sur les acides nucléiques natifs. Cette propriété a été mise à profit :

1°) Pour étudier par spectrofluorimétrie les modalités de l'interaction du BET avec les acides nucléiques.

2°) Pour étudier les réactions d'hydribation et les réactions d'échange entre polyribonucléotides.

3°) Pour établir une méthode spectrofluorimétrique de dosage des acides nucléiques et des nucléases.

## I - ETUDE PAR SPECTROFLUORIMETRIE DES MODALITES DE L'INTERACTION DU BROMHYDRATE D'ETHIDIUM AVEC LES ACIDES NUCLEIQUES.

Les problèmes étudiés ont été :

- L'importance de la structure secondaire. Cette fixation semble spécifique de la structure à deux brins native des acides nucléiques.

- L'importance de la structure primaire.

La fixation est indépendante de la composition en base des AN, de leur poids moléculaire lorsque celui reste élevé.

Les conditions d'environnement :

- effet de la force ionique.

La fixation diminue lorsque la concentration en sel augmente, puis lorsque cette concentration devient très élevée, elle en devient indépendante.

- effet du pH

Le pH a très peu d'influence sur la fixation dans le domaine de stabilité des acides nucléiques.

Après avoir montré que la réaction de fixation du BET sur les AN était une réaction d'équilibre, l'étude quantitative de cet équilibre a été effectuée.

Ont été déterminés :

- Le nombre de sites de fixation.

Ce nombre est de 1 pour 5 nucléotides dans le cas du DNA et de 1 pour 10 dans le cas du RNA.

- Les constantes intrinsèques d'association.

Elles ont été déterminées dans différentes conditions, en particulier à différentes températures. Ceci a permis de déterminer les grandeurs thermodynamiques caractéristiques de cet équilibre.

Pour déterminer la nature des sites de fixation, ont été également étudiés :

- L'effet de l'urée sur cet équilibre :

L'urée diminue considérablement la valeur de la constante d'association intrinsèque apparente sans diminuer le nombre de sites total disponibles.

- La compétition avec la quinacrine et l'actinomycine:

La quinacrine inhibe la fixation du BET de façon compétitive, c'est à dire qu'elle diminue la constante intrinsèque d'association apparente, sans affecter le nombre total de sites disponibles alors que l'actinomycine inhibe la fixation du BET de façon non compétitive en ne diminuant que le nombre de sites total sans affecter la constante intrinsèque d'association.

- Les modifications des propriétés macromoléculaires du DNA :

- augmentation de la viscosité intrinsèque du complexe DNA-BET.

- allégement en gradiant de densité de chlorure de césium du complexe.

Cette dernière propriété semble liée à une compétition du BET avec les ions césium fixés sur le DNA.

- Etude de la stabilisation contre la dénaturation thermique du DNA.

Une élévation très importante de la température de fusion du DNA est observée.

De plus ont été étudiés les raisons de cette augmentation de fluorescence lorsque le BET se fixe sur le DNA. Ont été alors étudiées les fixations des dérivés de structures chimiques voisines, la fluorescence de ces composés en solution organique, la variation de fluorescence du BET et de son spectre d'absorption avec la température, et avec la concentration d'urée dans le milieu.

L'ensemble de ces résultats a conduit, à proposer pour représenter la fixation du BET sur les AN le schéma suivant :

à faible force ionique :

$$BET\text{-}H_2O + AN \rightleftharpoons BET\text{-}AN + H_2O$$

à force ionique élevée :

$$BET\text{-}H_2O + AN\text{-}Me \rightleftharpoons BET\text{-}AN + Me\text{-}H_2O + H_2O$$

Me signifiant le métal fixé sur le DNA.

Ce qui signifie que le BET existerait, en solution aqueuse, solvaté, que cette eau fixée serait responsable de la désactivation du BET en solution. La fixation du BET sur les AN protégerait le BET de l'interaction avec le solvant et augmenterait ainsi sa fluorescence.

Ceci est suggéré par le fait que les spectres d'absorption et de fluorescence du BET en solution organique et du BET fixé sur les AN sont tout à fait identiques, et par les valeurs d'entropie trouvées pour la fixation du BET à faible force ionique ($\Delta S^\circ$ = + 29 u.e par mole de BET lié). Cette valeur trouvée traduit une augmentation du désordre qui serait provoquée par la libération de ces molécules d'eau. Ceci est également montré par l'effet de l'urée, qui détruisant les réseaux d'eau liée, augmente la fluorescence du BET libre et diminue l'affinité du BET pour le DNA.

D'autre part, il a été montré que l'hypothèse de la compétition des ions avec le BET pour leur fixation sur le DNA, traduit par la deuxième équation du schéma, rendait compte des résultats observés.

## II - ETUDE DES REACTIONS D'HYBRIDATION ET DES REACTIONS D'ECHANGE ENTRE POLYRIBONUCLEOTIDES

La fixation du BET est très différente selon la structure secondaire des polyribonucléotides. Elle est importante pour les structures à deux brins faible pour les structures à trois brins,

négligeable pour les structures à un seul brin . Les mesures de changement de fluorescence accompagnant cette interaction permet donc de distinguer immédiatement une structure à 1, 2 et 3 brins , et se prêtent facilement à l'étude des réactions d'hybridation. De cette manière, le complexe à deux brins poly (AI) qui ne peut être caractérisé par spectrophotométrie est ici mis en évidence de cette façon.

De même ces différences de fixation selon les structures des polyribonucléotides permettent d'étudier facilement les réaction d'échange entre polyribonucléotides. Il a été mis en évidence par ce procédé la réaction suivante :

$$\text{poly (A-2I)} + \text{poly U} \rightleftharpoons \text{poly AU} + 2\ \text{poly I}$$
$$\text{poly (A-2I)} + 2\text{poly U} \rightleftharpoons \text{poly A-2U} + 2\ \text{poly I}$$

Cette propriété du bromhydrate d'éthidium fournit donc un outil particulièrement commode pour l'étude de tout problème concernant les hybridations entre polyribonucléotides.

## III - ETABLISSEMENT D'UNE METHODE DE DOSAGE SPECTROFLUORIMETRIQUE DES ACIDES NUCLEIQUES ET DES NUCLEASES

L'augmentation de la fluorescence du BET en présence d'acides nucléiques étant proportionnelle à la concentration, lorsque celle-ci reste petite devant la concentration du BET, il en résulte, que la mesure de cette augmentation de fluorescence permet de doser aisément les acides nucléiques.

L'étude des conditions du dosage a été faite. Il n'a pas été trouvé de substances capables d'interférer notablement dans ce dosage. La sensibilité est très appréciable puisque 0,01 µg/ml de DNA ou de RNA peut être déterminé de cette façon.

Parallèlement l'affinité du BET diminuant lorsque le DNA ou le RNA est hydrolysé par une nucléase, il est possible de mesurer l'activité enzymatique en mesurant cette chute d'affinité par la diminution de fluorescence du BET qui l'accompagne. L'avantage de cette méthode est de pouvoir étudier la cinétique des nucléases en utilisant des concentrations de substrat très petites.

Nous avons alors utilisé cette méthode pour étudier l'inhibition des désoxyribonucléases par le bromhydrate d'éthidium. les résultats de cette inhibition s'interprètrent en admettant que l'inhibition observée est due à la complexation du substrat par l'inhibiteur. La cinétique de l'inhibition suit en effet la théorie de REINER concernant l'inhibition par complexation du substrat.

Après la rédaction de ce travail, nous apprenons la publication d'un article de WARING M.J. (J. Mol. Biol. 13/269/1965). Cet auteur a étudié par spectrophotométrie la fixation du bromhydrate d'éthidium sur les acides nucléiques. Les résultats obtenus par cette méthode sont tout à fait comparables à ceux que nous avons obtenus par spectrofluorimétrie. Toutefois, ils sont en désaccord sur un point. Cet auteur ne trouve que peu de différences de fixation du bromhydrate d'éthidium entre le DNA dénaturé chauffé et le DNA natif. Ce fait est vraisemblablement du au fait que le DNA utilisé s'était renaturé comme cet auteur le suppose lui-même. En effet, le DNA utilisé est du DNA de micrococque et MARMUR J. et DOTY P. (Thermal denaturation of deoxyribonucleic acids. J.Mol. Biol. 3/585/1961) ont clairement montré que la renaturation des DNA est plus complète lorsque l'hétérogénéïté en base est plus petite, c'est à dire lorsqu'on utilise des DNA d'origine bactérienne.

# BIBLIOGRAPHIE


1) *BELLIN J.S.* Photochemistry and Photobiology 4 / 33/1965

2) *BRITTEN R.J. et ROBERTS R.B.* Science 131/32/1960

3) *BRUNING W. et HOLTZER A.* J. Am. Chem. Soc. 83/4865/1961

4) *BURTON K.* Biochem. J. 62/315/1956

5) *CHAMBRON J., DAUNE M. et SADRON C.* C.R. Acad. Sc. 258/4867) 1964

6) *CLARKE H.B., CUSWORTH D.C. et DATTA S.P.* Biochem. J. 58/146/1954

7) *DEFRANCE P. et DE LESDAIN N.* Path. Biol. 10/153/1962

8) *DICKINSON L., CHANTRILL D.H., INKLEY G.W. et THOMPSON M.J.* Brit. J Pharmacol. 8/139/1953

9) *DISCHE Z.* in "The Nucleic Acids" *CHARGAFF E. ET DAVIDSON* J.N. ed. Academic Press publ. New York 1955 t. Ip.286

10) *DOTY P., BOEDKTER H., FRESCO J.R., HASELKORN R. et LITT M.* Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 45/482/1959

11) *DOTY P., MARMUR H. et SUEOKA W.* Brookhaven Symposia in biology 12 (1959)

12) *DOTY P., Mc GILL B.B. et RICE S.A.* Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 44/432/1958

13) *DRUMMOND D.S., SIMPSON-GILDEMEISTER V.F.W. et PEACOCKEA.R.* Biopolymers 3/135/1965

14) *DRYER R.C., TAMMES A.R., et ROUTH J.J.* J. Biol. Chem. 225/177/1957

15) *EDSALL J.T. et WYMAN J.* "Biophysical Chemistry" Academic Press publ. New York 1958 t. I

16) *ELLIOT W.H.* Biochem. J 86/562/1963

17) *FRESCO J.R.* in "Informational macromolecules" *VOGEL H.S., BRYSON V. et LAMPEN J.O.* ed. Academic Press publ. New York 1963 p. 121

18) *GELLERT M., SMITH C.E., NEVILLE D. et FELSENFELD G.* J. Mol. Biol. 11/445/1965

19) *HAWKING F. in* "Experimental Chemotherapy" *SCHNITZER R.J. et HAWKING F.* ed. Academic Press publ. New York 1963 p.129

20) *HENDERSON J.F.* Cancer Res. 23/491/1963

21) *HIATT H.H.* J. Mol. Biol. 5/217/1962

22) *INMAN R.B., SCHILDKRAUT C.L. et KORNBERG A.* J. Mol. Biol. II/285/1965

23) *JACQUEMIN-SABLON A.* Communication personnelle

24) *JACQUEMIN-SABLON A., LAVAL J., LE TALAER J.Y., LE PECQ J.B. et PAOLETTI C.* C.R.A cad. Sc. 259/2551/1964

24 bis) *JOB P.* Ann. chim. 9/113/1928

25) *JORDAN D.O.* "CHEMISTRY of NUCLEIC ACIDS" Butterworth Publ. Washington 1960 p. 169-173

26) *KANDASWAMY T.S. et HENDERSON J.F.* Nature 195/85/1962

27) *KAUZMANN W.* Adv. protein chemistry 14/1/1959

28) *KIRBY K.S.* Biochem. J 66/495/1957

29) *KISSANE J.M. et ROBINS E.* J. Biol. Chem. 233/184/1958

30) *KLEINWÄCHTER V. et KØUDELKA J.* Biochim. Biophys. Acta 91/539/1964

31) *KLOTZ I.M.* in "Horizons in biochemistry" *KASHA M. et PULLMAN B.* ed. Academic press publ. New York 1962 p.523

32) *KLOTZ I.M. et STRYKER V.H.* J Am. Chem. Soc. 82/5169/1960

33) *KURIHARA K., HACHIMORI Y. et SHIBATA K.* Biochim. Biophys. Acta 68/434/1963

34) *KURNICK N.B.* in "Methods of Biochemical analysis" *GLICK D.* ed. Interscience publ. New York 9/1/1962

35) *LAMONTHEZIE N. et GUERINEAU M.* Bull. Soc Chim. Bio. sous presse 1965

36) *LAVAL J.* à paraitre

37) *LEITH J.D.* Biochim. Biophys. Acta 72/643/1963

38) *LE PECQ J.B.* Thèse doctorat d'état de Pharmacie Paris 1963

39) *LE PECQ J.B., LE TALAER J.Y., FESTY B. et TRUHAUT R.* C.R. Acad. Sc. 254/3918/1962

40) *LERMAN L.S.* J. Mol. Biol. 3/18/1961

41) *LERMAN L.S.* Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 49/94/1963

42) *LERMAN L.S.* J. Cell. Comp. Physiol. 64 suppl. n°1/1/1964

43) *LEVINE L., GORDON J.A. et JENCKS W.P.* Biochemistry 2/168/1963

44) *LOISELEUR J.* in "Techniques de laboratoires" *LOISELEUR J.* ed. Masson publ. Paris 1954 t. I p.99

45) *LONG C.* in "Biochemists' Handbook" *SPON E. et SPON F.N.* publ. Londres 1961 p. 28

46) *LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J.* J. Biol. Chem. 193/263/1951

47) *MAHLER H.R. et MEHROTRA B.D.* Biochim. Biophys. Acta 68/211/1963

48) *MASSOULIE J., BLAKE R., KLOTZ L. et FRESCO J.* C.R. Acad. Sc. 259/3104/1964

49) *NEWTON B.A.* J. Gen. Microbiol. 17/718/1957

50) *NEWTON B.A.* in "Advances in Chemotherapy" *GOLDIN A. et HAWKING F.* ed. Academic Press publ. New York 1964 vol. I p.35

51) *OSTER G.* C.R. Acad. Sc. 232/1708/1951

52) *OSTER G. et NISHIJIMA Y.* J Am. Chem. Soc. 78/1581/1956

53) *PEACOCKE A.R. et SKERRET J.N.H.* Trans. Faraday Soc. 52/261/1956

54) *PRINGSHEIM P.* in "Fluorescence and phosphorescence" Interscience publ. New York 1949 p.315

55) *REICH E. et GOLDBERG I.H.* in "Progress in Nucleic acid Research" *DAVIDSON J.N. et COHN W.E.* ed. Academic Press publ. New York 1964 vol. 3 p.184

56) *REINER J.M.* in "Behavior of enzyme systems" Burgess publ. 1959 chap. 8

57) *ROBERTS S.D. et FRIEDKIN M.* J Biol. Chem. 233/483/1958

58) *ROSS P.D. et SCRUGGS R.L.* Biopolymers 2/79/1964

59) *SCATCHARD G.* An. N.Y. Acad. Sci. 51/660/1949

60) *SCHACHMAN H.K.* Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 28/409/1963

61) *SCHACHMAN H.K., GROPPER L., HANLON S. et PUTNEY F.* Arch. Biochem. Biophys. 99/175/1962

62) *SCHILDKRAUT C.L., MARMUR J. et DOTY P.* J. Mol. Biol. 4/430/1962

63) *SIGLER P.B., DAVIES D.R. et MILES H.T.* J. Mol. Biol. 5/709/1962

64) *SIGNER R. et SCHWANDER H.* Helv. Chim. Acta 32/853/1949

65) *SINSHEIMER R. J. Mol. Biol.* 1/43/1959

66) *STEINER R.F. et BEERS R.F.* in "Polynucleotides" Elsevier publ. 1961 chap. 7

67) *STOLLAR D. et GROSSMAN L.* J. Mol. Biol. 4/31/1962

68) *TANFORD C.* in "Physical Chemistry of Macromolecules" J. Wiley & Sons publ. New York 1961 p. 573

69) *THOMAS C.A. Jr et BERNS K.I.* J. Mol. Biol. 3/277/1961

70) *TUBBS R.K., DITMARS W.E. et VAN WINKLE Q.* J. Mol. Biol. 9/545/1964

71) *VINOGRAD J. et HEARST J.E.* Fortschritte d. Chem. Org. Naturst. 20/372/1962

72) *VINOGRAD J., MORRIS J., DAVIDSON N., et DOVE W.F.* Proc. Nat. Acad. Sci. 49/12/1963

73) *WARING M.J.* Biochim. Biophys. Acta 87/358/1964

74) *WIBERG J.S. et NEUMAN W.F.* Arch. Biochem. Biophys. 72/66/1957

75) *WURMSER R.* in "Traité de chimie biologique" Masson publ. Paris 1959 t. I p. 757

76) *YAMAGISHI H.* J. Cell. Biol. 15/589/1962

# TABLE DES MATIERES


Pages

- Abréviations et symboles utilisés .....
- Introduction ..... 1
- Chapitre I : Matériel et Méthodes ..... 3
  - A) Matériel ..... 3
  - B) Méthodes ..... 7
- Chapitre II : Etude des modalités de l'interaction du BET avec les acides nucléiques ..... 15
  - A) Démonstration de l'interaction ..... 15
  - B) Etude des modalités de l'interaction 23
    - 1) Méthode spectrofluorimétrique d'étude de l'interaction ..... 23
    - 2) Résultats de l'étude des modalités de l'interaction ..... 24
  - C) Caractéristiques moléculaires du complexe DNA-BET ..... 50
- Chapitre III: Interaction du BET avec les polyribonucléotides ..... 67
  - A) Etude des réactions d'hybridation entre polyribonucléotides ..... 67
  - B) Etude des réactions d'échange entre polyribonucléotides. Mise en évidence du déplacement du poly (A-2I) par le le poly U ..... 71
- Chapitre IV : Dosages spectrofluorimétriques des acides nucléiques et des nucléases à l'aide du bromhydrate d'éthidium. Application à l'étude de l'inhibition des nucléases par le bromhydrate d'éthidium ..... 77
    - 1) Dosages spectrofluorimétriques des acides nucléiques ..... 77
    - 2) Dosages spectrofluorimétriques des nucléases..... 83
    - 3) Etude de l'inhibition des DNases par le BET ..... 85
- Conclusion - Résumé ..... 89
- Bibliographie ..... 95

# DEUXIEME THESE

**Propositions données par la Faculté**

"DNA Extra Nucléaires"

**Vu et approuvé :**

*Paris, le 8 octobre 1965*

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Marc ZAMANSKY

Vu

et Permis d'imprimer :

**Le Recteur de l'Académie**

**de Paris,**

**Jean ROCHE**